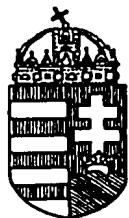


(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

212 661 A

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 02328

(22) A bejelentés napja: 1994. 08. 10.

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 7/06

A 61 K 33/08

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL
Szabadalmi Üjdonságvizsgálati Tárgyaló

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1996. 11. 28.

(72) Feltalálók:

dr. Mező Imre 13%, Budapest (HU)
dr. Lovas Sándor 12,5%, Omaha, Nebraska (US)
dr. Murphy, Richard F. 12,5%, Omaha, Nebraska (US)
dr. Pályi István 10%, Budapest (HU)
dr. Vincze Borbála 10%, Budapest (HU)
dr. Teplán István 8%, Budapest (HU)
dr. Gaál Dezső 7%, Budapest (HU)
dr. Seprődi János 6%, Budapest (HU)
dr. Vadász Zsolt 6%, Budapest (HU)
dr. Tóth Géza 5%, Szeged (HU)
Kálnay Adrienn 4%, Budapest (HU)
dr. Turi Gizella 4%, Budapest (HU)
Tanai Henrietta 2%, Budapest (HU)

(73) Szabadalmasok:

MTA Támogatott Kutatóhelyek Irodája 35%,
Budapest (HU)
Országos Onkológiai Intézet 35%,
Budapest (HU)
Creighton University 25%, Omaha,
Nebraska (US)
MTA Szegedi Biológiai Központ 5%,
Szeged (HU)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) Új, tumorgátló hatású GnRH analógok, valamint az ezeket hatóanyagként
tartalmazó gyógyászati készítmények

(57) KIVONAT

A találmány tárgyát képezik az X-R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-
R⁷-R⁸-Pro-R¹⁰-Y (I) általános képletű peptidek és gyógyászatilag elfogadható sóik, továbbá az ezeket tartalmazó tumorgátló hatású gyógyászati készítmények. Az (I) általános képletben

X jelentése hirdogénatom, acetilcsoport, vagy propionilcsoport, ha R¹ jelentése pGlu-tól eltérő; vagy intramolekuláris savamidkötés, ha R¹ jelentése pGlu;

R¹ jelentése pGlu, Glu, D-Trp, vagy D-Phe;

R² jelentése His, vagy D-Phe;

R³ jelentése adott esetben az indolil csoportján védeott L-, vagy D-Trp;

R⁴ jelentése Ser, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védeott Lys;

R⁵ jelentése Tyr, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védeott Lys, vagy His;

R⁶ jelentése Asp, Glu, D-Trp, D-Phe, vagy D-Cpa;
R⁷ jelentése Phe, Leu, vagy N-Me-Leu, vagy adott esetben az indolil csoportján védeott L-Trp;

R⁸ jelentése az ε-aminocsoportján adott esetben védeott Lys; Arg, valamint ha R⁶ jelentése Asp, és R⁸ jelentése Lys, akkor e két szubsztituens a Lys-csoport ε-aminocsoportján keresztül intramolekuláris gyűrűt képezhet;

R¹⁰ jelentése Gly, D-Ala vagy vegyértékvonal; és Y jelentése OH vagy NH₂ csoport, ha R¹⁰ jelentése Gly vagy D-Ala, és etil-amid-csoport, ha R¹⁰ jelentése vegyértékvonal.

A találmány szerinti GnRH analógokat a peptídkémiában ismert eljárásokkal állítják elő.

A

212 661

HU

A találmány új, tumorgátló hatású peptidekre, valamint azok sóira vonatkozik.

A hormon-függő rosszindulatú daganatok kezelésében az antiöstrogének mellett jelentős szerepet játszanak a gonadotropin-releasing hormon (GnRH) analógoi. Az alkalmazási terület kiterjed a rosszindulatú neoplasmák körén belül a prosztata- és mellrákra, endometriumra és más hormon-függő tumorokra. Ismertes, hogy ez a hipotalamikus eredetű faktor, (10 aminosavból felépülő peptidhormon) felelős a luteinizáló (LH) és follikulus stimuláló (FSH) hormonok szekréciójáért. A GnRH-k számos agonista és antagonista analógiáról bebizonyosodott, hogy nemcsak a szaporodás-biológiai folyamatok befolyásolásában használhatók fel eredményesen, hanem tumorgátló gyógyszerként is alkalmazhatók.

A legújabb publikációk arról számolnak be, hogy a GnRH analógoi nemcsak kémiai kasztrációon keresztül, hanem a tumorosejtekre közvetlenül hatva szelektív módon is kifejthetik daganatellenes hatásukat. Emberi emlő-, endometrium-, petefészek-, prosztata- és pankreas-daganat sejt-kultúrákban GnRH-t, illetve GnRH analógoit specifikusan kötő receptor(ok), illetve GnRH mRNA jelenlétét mutatták ki (Eidene, K. A., Flanagan, C. A., Millar, R. P., *Science* 229:989-991 (1985); Emons, G., Ortmann, O., Schally, A. V., Schulz, K. D., *Gynecol. Endocrinol.* 7. Suppl. 2. 71 (1993); Limonta, P., Dondi, D., Roberta, M., Moretti, R. M., Fermo, D., Garatti, E., Motta, M. J., *Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 797-800 (1993)), továbbá ezen sejt-vonalakon igazolták GnRH analógoi sejtproliferáció gátló hatását in vitro (Eidene, K. A., Flanagan, C. A., Harris, N. S., Millar, R. P., *Science*, 229, 989-991 (1987); Shaoni, Y., Bosin, E., Miinster, A., Levy, J., Schally, A. V., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1648-1651 (1989)).

Kísérleteink igazolták a tríciummal jelzett humán GnRH szuperagonista, a D-Phe⁶-GnRH(1-9)-etilamid (OVURELIN) specifikus kötődését MCF-7 és MDA-MB-231 humán emlődaganat sejt-vonalakon (Vincze, et. al., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 38, 119, 1991). Ezen eredmények az irodalommal összhangban (Y.E. Sharoni, et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1648-1651, 1989., T.J. Segal-Abramson, et.al., *Molec. Cell. Endocr.*, 85, 109-116, 1992) bizonyítják GnRH analógoit specifikusan kötő receptor vagy receptorok jelenlétét, mely alapfeltétele a direkt hatás kialakulásának. Hasonlóképpen a már gyógyászati alkalmazásba került D-Trp⁶-hGnRH (DECAPEPTYL) agonista analóg esetén is bizonyították, hogy az MDA-MB-231 tumor sejt-vonalon receptorral rendelkezik (Tetsu Yano, et. al., *Breast Cancer Res. Treat.* 21, 35-45, 1992) és direkt növekedésgátló hatása van az említett humán emlőtumor sejt-vonalon (Sharoni J., et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86, 1648-1651, 1989, Néri C., et. al. *Breast Cancer Res. Treat.* 15, 85-93, 1990).

A hatékony koncentráció alapján feltételezhető, hogy az alacsony affinitású kötőhely ill. kötőhelyek fontos szerepet játszhatnak a direkt antitumor hatás kialakulásában.

A tapasztalatok szerint a GnRH analógoi direkt

tumorellenés hatása csak viszonylag magas peptid koncentráció (10^{-6} - 10^{-5} M) esetén alakul ki (Sharoni, et. al. 1989; Scott, W. N., Muller, P., Miller, W. R., *Eur. J. Cancer* 27, 1458-1461 (1991); Vincze, B., Pályi, I., Daubner, D., Kremmer, T., Számel, I., Bodrogi, I., Sugár, J., Seprődi, J., Mező, I., Teplán, S., Eckhardt, S. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 38, 119-126 (1991); Segal-Abramson, T., Kitroser, H., Levy, J., Schally, A. V., Shatoni, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2336-2339 (1992)). Ez a farmokológiai hatás csak akkor érhető el, ha az aktív molekula nemcsak nagy koncentrációban hanem hosszú ideig is jelen van a szervezetben (Schally, A. V., In: Belford P, Pinotti J. A., Eskes, T. K. A. B. (eds) *General Gynecology*. Vol 6, pp 3-22; (Partenon Publishing, Carnforth, England), 1989, Bokser, K., Zalatnay, A., Schally, A.V., *J. Reprod. Fertil.* 85, 569-579 (1989).

A GnRH-t hosszú időn keresztül nem tartották faj-specifikus hormonnak, csak a nyolcvanas évek elején vált ismertté, hogy bizonyos hal-, ill. madárfajták gonadoliberinjének szerkezete különbözik az emlősökétől (King, J. A., Millar, R. P., *J. Biol. Chem.* 257, 10722-28 (1982); Sherwood, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2794-2798 (1983). A hal-, ill. madárfaj specifikus GnRH szerkezete a 7. és/vagy 8. aminosavpozíciójában mutat különbséget az emlős GnRH-hoz viszonyítva. A csirke-GnRH, ill. a lazac-GnRH analógiái emlős állatok LH, illetve FSH felszabadítását tekintve nem szuperaktívak, így a megfelelő dózistartományban nem deszenzitálják a hipofízis gonadotróp sejtjeit. Az emlős, így a humán GnRH aminosav összetétele a következő: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

1993-ban az Omaha-i Creighton University Medical

35 School kutatói az orsóhalból (*Petromyzon marinus*) a Lamprey-III-GnRH dekapeptidet (pGlu-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂) izolálták, majd állították elő. Azt találtuk, hogy a Lamprey-III-GnRH (a továbbiakban GnRH-III) a korábban említétek humán emlőtumor sejt-vonalakon jelentős tumor-növekedés gátló hatással rendelkezik. Ugyanakkor a GnRH-III endokrinológiai hatását vizsgálva patkány hipofízisen, szuperfúziós módszerrel megállapítottuk, hogy ez a hormon a humán GnRH-hoz viszonyítva mintegy 1000-szer gyengébb LH-felszabadító hatással rendelkezik. In vivo vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy három cikluson keresztül történő tartós kezelés tartama alatt, nagy dózisban sem gátolja a nőstény patkányok ovulációját, tehát nem okoz deszenzitizációt és kémiai kasztrációt, ezzel összefüggésben tumoros állatokon – ellentétben más ismert, azonos hatásmechanizmus szerint ható humán hormon-analóggal – a kezelés kezdetén jelentkező tumorövekedeés („flair up”) nem mutatkozott.

Ezekből a vizsgálatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a GnRH-III szelektív és nagy hatású tumorgátló vegyület.

A találmány célja olyan humán GnRH, hGnRH és orsóhal (GnRHIII) analógoi előállítása, amelyek emberi daganat sejt-kultúrákban antitumor hatást mutatnak.

A feladatot az (I) általános képletű peptidek, gyógyászatilag elfogadható sóik és észtereik előállításával oldottuk meg.

A találmány azon a félismerésen alapul, hogy a vegyületek közvetlen tumorgátló hatással rendelkeznek az emberi daganatsejtekkel szemben. Nem várt módon azok a vegyületek is mutatnak közvetlen tumorgátló hatást, amelyek csak természetes, L-aminoasavakat tartalmaznak. Az eddig ismert, antitumor hatású GnRH-analógok ugyanis, agonisták esetében legalább egy, antagonisták esetében általában több nemtermészetes D-aminoasavat tartalmaznak.

Felismertük továbbá, hogy a tumorgátló hatású GnRH analógok több aminosavcsoportja is helyettesíthető Lys-csoporttal anélkül, hogy a molekula kedvező tumorgátló hatása csökkenne. Ez azért előnyös, mert a Lys ε-aminocsoportján keresztül a peptid olyan, megfelelően megválasztott nagyobb molekulákhöz kapcsolható, amelyek acilező csoportot tartalmaznak. Ebben az esetben a makromolekulák a peptid hordozó molekulái lehetnek és ezáltal elősegíthetik a daganatellenes hatás kifejtéséhez szükséges állandó, magas GnRH-analóg szint fenntartását a szervezetben.

A találmány tárgyát képezik az X-R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷-R⁸-Pro-R¹⁰-Y(I) általános képletű peptidek, valamint ezek gyógyászatilag elfogadható savaddíciós sói.

A találmány tárgyát képezik továbbá az (I) általános képletű peptideket és/vagy gyógyászatilag elfogadható sóikat tartalmazó gyógyszerkészítmények.

Az (I) általános képletben

X jelentése hidrogénatom, acetilcsoport, vagy propionilcsoport, ha R¹ jelentése pGlu-tól eltérő; vagy intramolekuláris savamidkötés, ha R¹ jelentése pGlu;

R¹ jelentése pGlu, Glu, D-Trp, vagy D-Phe;

R² jelentése His, vagy D-Phe;

R³ jelentése adott esetben az indolil csoportján védett L-, vagy D-Trp;

R⁴ jelentése Ser, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védett Lys;

R⁵ jelentése Tyr, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védett Lys, vagy His;

R⁶ jelentése Asp, Glu, D-Trp, D-Phe, vagy D-Cpa;

R⁷ jelentése Phe, Leu, vagy N-Me-Leu, vagy adott esetben az indolil csoportján védett L-Trp;

R⁸ jelentése az ε-aminocsoportján adott esetben védett Lys; Arg, valamint ha R⁶ jelentése Asp és R⁸ jelentése Lys, akkor e két szubsztituens a Lys-csoport ε-aminocsoportján keresztül intramolekuláris gyűrűt képezhet;

R¹⁰ jelentése Gly, D-Ala vagy vegyértékvonal; és Y jelentése OH vagy NH₂ csoport, ha R¹⁰ jelentése Gly vagy D-Ala, és etil-amid-csoport, ha R jelentése vegyértékvonal.

A leírásban alkalmazott rövidítések megegyeznek a peptidkémiai általános előfogadott nomenclátrával, amelyet a J. Biol. Chem. 241, 527 (1966); 247, 977 (1972) ismertet; továbbá a D-Nal jelentése β-(2-naftil)-D-alanin, D-Cpa jelentése p-klórfenil-D-alanin, D-Pal jelentése β-(3-piridil)-D-alanin. A leírásban megnevezett amino-

savak mindegyike L-konfigurációjú akkor, ha másként nem jelöljük.

A találmány szerinti peptidekben a Trp-indolilcsoportjának védőcsoportja előnyösen For, a Lys-csoport ε-aminocsoportjának védőcsoportja előnyösen Fmoc.

Az (I) általános képletű peptidek gyógyászatilag elfogadható sói a gyógyászatilag elfogadható szerves vagy szervetlen savakkal képzett savaddíciós sók, fgy például acetát sók vagy hidrokloridok.

Az (I) általános képletű vegyületeket a peptidkémiai általános módszerekkel állíthatjuk elő folyadékfázisban (megfelelően védett aminosavakból, vagy belőlük előállított fragmensek adott sorrendben végrehajtott kondenzációjával), vagy különösen előnyösen -szilárd fázisú peptid-szintézissel. Ha egy peptidet sója formájában kapunk meg, azt ismert módon más sóvá alakíthatjuk át. A kapott észterek észtercsoportjait kívánt esetben lehasíthatjuk.

Az (I) általános képletű peptideket elsősorban injekciók, infúziók vagy intravazalis készítmények formájában adagolhatjuk. Minthogy a vegyületek az emésztőrendszerben lebomlanak, önmagukban orálisan nem, de minden más módon adagolhatók. Az injekciókat beadhatjuk intramuszkulárisan, intravénásan vagy szubkután.

Az (I) általános képletű hatóanyagokból ismert gyógyszeres technológiai műveletekkel állíthatunk elő gyógyszerkészítményeket. A hatóanyagból a szokásos módon (pl. mikrokapszula, vagy mikrogranulátum formában) nyújtott hatású készítményeket is előállíthatunk. A hatóanyag mellett a gyógyszerkészítésben szokásosan alkalmazott segédanyagokat használhatunk, így például injekciós célra alkalmas folyékony hordozóanyagot (izotóniás sőoldatot, vagy foszfátpufferoldatot). A készítmények szükség szerint tartalmazhatnak stabilizátorokat (pl. aszcorbinsavat) is.

A találmány szerinti peptidek előállítására az alábbi kiviteli példákat adjuk meg.

A vég-, és köztitermek kémiai tisztaságát és azonosítását vékonyréteg kromatográfiával (TLC) a végtermékekkel pedig még HPLC kromatográfiával is ellenőrizzük.

A vékonyréteg kromatográfiás értékeket Kieselgel (DC Alufolien, Merck) lemezeken az alábbi oldószerekben határozzuk meg.

- 45 1. Etilacetát – Piridin – Víz – Ecetsav 15:20:6:11
2. Etilacetát – Piridin – Víz – Ecetsav 30:20:6:11
3. Etilacetát – Piridin – Víz – Ecetsav 60:20:6:11
4. Etilacetát – Piridin – Víz – Ecetsav 120:20:6:11
5. Etilacetát – Piridin – Víz – Ecetsav 240:20:6:11
- 50 6. n-Butanol – Ecetsav – Víz 4:1:1
7. n-Butanol – Ecetsav – Víz 4:1:2

A védett aminosavak oldalláncai Tyr, Ser esetében benzil csoporttal, Lys esetében benzil-oxikarbonil (2), vagy intermedier peptid analóg készítésénél 9-fluorenil-metiloxikarbonil (Fmoc) védőcsoporttal, Arg és His esetén tozil csoporttal (Tos), a Glu és Asp karboxil csoportjait ciklohexil csoporttal (Chx) védjük.

A találmányt közelebbről az alábbiakban felsorolt előnyös analógok előállítási eljárásának ismertetésével mutatjuk be:

1. $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^5\text{-GnRH-III}$,
2. $\text{Lys}^5\text{-GnRH-III}$,
3. $\text{Lys}^5\text{-cyclo[Asp}^6\text{-Lys}^8\text{]-GnRH-III}$,
4. $\text{Lys}^5\text{-}[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
5. $\text{Lys}^4\text{-}[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
6. $\text{Lys}^4\text{-GnRH-III}$,
7. $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Ac})]^4\text{-GnRH-III}$,
8. $\text{Glu}^6\text{-GnRH-III}$,
9. $\text{cyclo[Asp}^6\text{-Zys}^8\text{]-GnRH-III}$,
10. $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
11. $\text{H-D-Trp}^1, [\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8, \text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
12. $\text{Ac-D-Trp}^1, \text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
13. $\text{H-D-Trp}^1, \text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
14. $[\text{Trp(For-Ind)}]^3, ^7\text{-GnRH-III}$,
15. $\text{Phe}^7\text{-GnRH-III}$,
16. $\text{GnRH-III(1-9)-etilamid}$,
17. $\text{Lys}^5, \text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
18. $\text{Lys}^4, \text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
19. $\text{H-Glu}^1, \text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
20. $\text{Lys}^5, \text{D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-etilamid}$,
21. $\text{Lys}^4, \text{D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-etilamid}$,
22. $\text{Lys}^5, \text{D-Cpa}^6\text{-hGnRH(1-9)-etilamid}$.

Néhány kiemelt fontosságú analógunknál a következő eredményeket kaptuk kapacitás faktorát HPLC-vel vizsgálva:

Analóg	k'	% MeOH
3. példa	3,57	38 %
5. példa	9,28	55
6. példa	3,57	30
7. példa	11,57	30
8. példa	7,57	30
17. példa	9,57	38
19. példa	14,1	38
19. példa	8,71	40

1. mosás diklór-metánnal	háromszor	2 perc
2. hasítás trifluor-ecetsav és diklór-metán 1:2 térfogatarányú elegyével	egyszer	2 perc
3. hasítás trifluor-ecetsav és diklór-metán 1:2 térfogatarányú elegyével	egyszer	25 perc
4. mosás diklór-metánnal	háromszor	2 perc
5. mosás etanollal	háromszor	2 perc
6. mosás kloroformmal	háromszor	2 perc
7. semlegesítés trietyl-amin és kloroform 1:9 térfogatarányú elegyével	kétszer	3 perc
8. mosás kloroformmal	kétszer	2 perc
9. mosás diklór-metánnal	háromszor	2 perc
10. Boc-aminosav hozzáadása		—
11. kapcsolás diizopropil-karbodiimiddel	egyszer	120-300 perc
12. mosás diklór-metánnal	kétszer	2 perc
13. mosás etanollal		

A Boc védőcsoport lehasításakor a mellékreakciók megakadályozására 0,5 m% indol és 0,2 v% tioanizol vagy 2 v% anizol és 0,2 m% L-metionin elegyét alkalmazzuk.

A védett aminosavakat általában karbodiimidés módszerrel kapcsoljuk, de nagy térikötéssű oldalláncú aminosavaknál (pl. Leu, Trp, Cpa) BOP-reagenst használunk. Poziív ninhidrin reakció esetén karbodiimidés kapcsolás

ISCO model 2350 pump 1 ml/perc, ISCO V4 detektor (215 nm). Oszlop: BST, ODS Hypersil 5 μm , 270x4 mm. Eluens: MeOH – 0,1 M NaH_2PO_4 pH = 2,22

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

10 PÉLDÁK:

1. példa:

$(\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc}))^5\text{-GnRH-III}$

A peptidet automatikus peptidszintetizátort használva benzhidrilamin gyantán (kapacitás: 0,65 milliekvivalens/g) állítjuk elő. A Boc-glicin védett aminosavat a gyanta kapacitására számítva három ekvivalens feleslegben használjuk, a védett aminosaval ekvivalens mennyiségű DIC kondenzálószert és ugyanakkor ekvivalens mennyiségű HOBt katalizátort használunk. A Boc-Gly-OH felkapcsolásának reakcióideje 12 óra. Ezután a gyantához kapcsolás teljességeknek ellenőrzésére a gyanta – védett aminosav vegyületet ninhidrin reakcióval vizsgáljuk. A Boc-Gly-OH gyantához kapcsolása általában első kapcsolásra tökéletes; ha esetleg a ninhidrin reakció pozitív eredményt adna (ami arra utal, hogy a benzhidril-amin-gyanta aminosavcsoportjai nincsenek teljesen szubsztituálva), a gyantához kapcsolást szimmetrikus anhidrid módszerrel tehetjük teljessé. (Tömegnövekedés alapján a gyanta kapacitása 75–80%-a a gyártó cégg által megadott kapacitásnak.)

A Boc-Gly-BHA gyantát a szokásos módon hasítjuk és semlegesítjük, ezután a peptidszintézist lépésről lépésre elvégezzük a következő vázlat szerint

után szimmetrikus anhidrid, BOP-reagenssel végzett kapcsolás után BOP-reagenssel rákapcsolást alkalmazunk.

A szintézis során 0,5 mMol BHA gyantára a szekvenciának megfelelő sorrendben háromszoros feleslegben Boc-aminosavat, mól arányos DIC kapcsolószert és HOBt katalizátort használunk dimetilformamidos oldatban. A jelen példában az 5. helyzetű aminosav esetén Boc-L-Lys(ε-Fmoc)-OH védett aminosavat használunk.

Az oldalláncok védőcsoportjait és a peptidet a gyantáról cs. ppfolyós HF segítségével távolítjuk el úgy, hogy a peptidgyanta vegyületet 0,25 mMól peptid-BHA gyanta esetén 2,5 ml 10 tömeg% p-krez lt tartalmazó anizol és 100 mg ditio-treitol jelenlétében körülbelül 20–25 ml HF-ban 0 °C-on 1 órán át tartsuk. A HF-ot csökkentett nyomáson eltávolítjuk, a maradékot abszolút dietil-éterrel kezeljük, és a szilárd maradékot a peptid t 15–33 térfogat%-os ecetsavoldatban oldjuk le. A peptid hidrogén-fluorid-sóját jelen esetben 33 tömeg%-os ecetsavban Sephadex G-25 oszlopon gélszűréssel tisztítjuk. kb. a 85%-os kémiai tisztaságú nyers termék tömege: 360 mg. $R_{f2} = 0,5$.

Ezt követően a peptidet középnyomású kromatográfiás módszerrel C₁₈ reverz fázisú szilikagél oszlopon gradiens oldatok segítségével tisztítjuk.

2. példa:

Lys⁵-GnRH-III

240 mg 1. példában leírt nyers intermedier peptid származékot 10 ml DMF-víz 1:1 arányú elegyében oldjuk, majd keverés és jeges vízhűtés mellett 2 ml piperidint adunk az oldatba. 2,5 óra múlva bepároljuk. Sephadex G-25 oszlopon 33% ecetsavban tisztítjuk. A frakciókat TLC-vel vizsgáljuk és a főterméket gyűjtjük. A nyers 2. példa szerinti terméket MPLC kromatografiával tisztítjuk.

Körülmények:

Oszloptöltet: Prepex C-18 (25-40u, Phenomenex, USA)

Oszlop: 400 mm × 25 nm átmérő

Eluens: A: 0,05 M ammóniumacetát (pH = 4,00) – metanol 70–30

B: 0,05 M ammóniumacetát (pH = 4,00) – metanol 50–50

az A és B oldalatokból képzett gradiens elució

A tiszta főfrakciót gyűjtjük és ezután a fenti oszlopon gradiens elucióval sőtalanítjuk és tisztítjuk.

Eluens: A: 10%-os ecetsav 400 ml

B: 80A:20 izopropanol 400 ml

A tiszta frakciót gyűjtjük, a maradékot liofilizáljuk. Tömege: 77 mg $R_{f1} = 0,40$, $R_{f2} = 0,15$.

3. példa:

Lys⁵, cyclo[Asp⁶-Lys⁸]-GnRH-III

a. 120 mg az 1. példában leírt nyers intermedier peptidszármazékot sósav addíciós sóvá alakítjuk, olymódon, hogy az 1. peptidet 6 ml vízben oldjuk és az oldathoz 2 ml 0,1 N sósav oldatot adunk. Az oldatot vákuumban száraz maradékig bepároljuk. A visszamaradó sósavas só tömege 102 mg. $R_{f2} = 0,5$.

b. Ciklizálás:

29 mg 3/a. peptid-hidrokloridot 25 ml DMF-ben oldunk, 0 °C-ra hűtjük az oldatot. 200 µl 1%-os nátriumhidrogénkarbonátot adunk az oldathoz. Közben 10 mg BOP-reagenst és 10 mg 1-hidroxi-benztriazolt 5 ml DMF-ben oldunk, majd lassan a fenti vizes oldathoz adagoljuk. 170 µl Diizopropil-etylaminból 5 ml DMF-fel törzsoldatot készítünk és ebből 200 µl-t a reakció-elegyhez adunk. Egy éjszakán át szobahőmérsékleten

keverjük. A keletkező intermedier peptidet ($R_{f2} = 0,6$) izolálás nélkül továbbalakítjuk.

c. Fmoc csoport eltávolítása:

A 3/b. reakcióelegyet vákuumban bepároljuk. Etilacetáttal eldörzsöljük, szűrjük. A szilárd maradékot 5 ml

DMF-ben oldjuk. Az oldathoz 5 ml DMF és 200 µl piperidin elegyét adjuk. A reakcióelegyet vákuumban bepároljuk. A maradékot 33 térfogat%-os ecetsavban oldjuk és Sephadex G-25 oszlopon tisztítjuk. A főterméket tartalmazó frakciókat MPLC módszerrel tisztítjuk.

Eluens: A: 0,05 M ammóniumacetát – metanol

70–30

B: 0,05 M ammóniumacetát – metanol

30–70

15 A tiszta frakciót kétszer liofilizáljuk. Tömege: 11 mg, $R_{f2} = 0,35$, $R_{f1} = 0,187$.

4. példa:

Lys⁵,(Lys(ε-Fmoc))⁸-GnRH-III

20 Az 1. példa szerinti módszerrel, de a GnRH-III szekvenciájában a 8-as helyzetű Boc-L-Lys(ε-Z)-OH helyett Boc-L-Lys(ε-Fmoc)-OH, míg az 5-ös helyzetben Boc-His(Tos)-OH helyett Boc-L-Lys(ε-Z)-OH védeott aminosav-származékot használunk.

25 Tisztításra az 1-es példa szerinti módszert használjuk. Nyers (kb. 80%-os kémiai tisztaságú) termék. Súlya: 335 mg, $R_{f2} = 0,55$.

5. példa:

Lys⁴,(Lys(ε-Fmoc))⁸-GnRH-III

30 1 m Mol BHA-gyantát használva mindenben az 1. példában leírt módszer szerint járunk el, de a peptid 8. tagjaként Boc-Lys(ε-Fmoc)-OH, míg 4. tagjaként pedig Boc-L-Lys(ε-Z)-OH védeott aminosavat alkalmazunk. Sephadex G-25 oszlopon történő tisztítás után 1,04 g nyers kb. 80% tisztaságú nyers peptidet nyerünk. $R_{f2} = 0,29$.

Tisztítás:

35 40 550 mg nyers terméket 20 térfogat%-os ecetsavban oldunk, majd a 2. példa szerint MPLC oszlopra viszszük és először 200 ml 20 térfogat%-os ecetsavval (izokratikus elució) eluáljuk, majd gradiens elucióval tisztítjuk.

A oldat: 20 térfogat%-os ecetsav

B oldat: A oldat: izopropanol = 3 : 1 elegy

A oldat: 400 ml – B oldat: 400 ml, linearis gradiens. A frakciót gyűjtjük, liofilizáljuk. Tömege: 217 mg. $R_{f2} = 0,45$, $R_{f1} = 0,18$.

6. példa

Lys⁴-GnRH-III

50 Az 5. példánál nyert nyers peptidből 200 mg-ot 10 ml DMF-ben oldunk. Az oldathoz 15 ml 10% piperidint tartalmazó DMF-et adunk, jeges vízhűtés mellett.

55 A reakcióelegyet 1 óra múlva bepároljuk. A maradékot 25% ecetsav-25% ecetsav-metanol 2:1 arányú elegyel középnyomású kromatográfiával gradiens elucióval tisztítjuk. 68 mg tiszta termék, melyet TLC-vel és HPLC-vel egységesnek találtunk. $R_{f1} = 0,5$, $R_{f2} = 0,067$, $R_{f1} = 0,05$.

7. példa:***[Lys(ε-Ac)]⁴-GnRH-III***

210 mg 5. példánál nyert nyers peptidet 30 ml DMF-ben oldottunk. Keverés és hűtés mellett az oldatba DIEA-t és 130 mg imidazolt adunk, majd az oldatba 5 ml DCM és 200 µl ecetsavanhidrid elegyét csepegtetjük. 1 óra múlva vákuumban bepároljuk. Dietiléterrel eldolgozzuk, a felülúszó étert dekantáljuk, majd a maradékot 15 ml DMF-ben oldjuk. Az oldathoz 200 µl piperidin 2 ml DMF-ben készült oldatát adjuk.

1 óra múlva bepároljuk. A maradékot 20%-os ecetsavban oldjuk és MPLC segítségével tisztítjuk. Elúció: 10% ecetsav és 10% ecetsav-metanol 6:4 elegyéből összeállított gradiens elúció. 70 mg tiszta termék, melyet TLC-vel és HPLC-vel egységesnek találtunk. $R_{f1} = 0,067$, $R_{f2} = 0,087$.

8. példa:***Glu⁶-GnRH-III***

Mindenben az 1. példa szerint járunk el, de a GnRH-III szekvenciájában a 6-os helyzetben Boc-Glu(OChx)-OH védett aminosavat használunk. A tisztítást a 2. példa szerint ammóniumacetát pufferben gradiens elúcióval végezzük. $R_{f2} = 0,19$, $R_{f1} = 0,086$.

9. példa:***cyclo[Asp⁶-Lys⁸]·GnRH-III***

Az orsóhal GnRH-III dekapeptidből kiindulva a 3. példa szerint sósavas sót készítünk, majd a 3. példa szerint cikлизálást végezzük. A terméket a 2. példa szerint tisztítjuk. $R_{f1} = 0,76$, $R_{f2} = 0,3$.

10. példa:***D-Ala¹⁰-GnRH-III***

Mindenben az 1. példa szerint járunk el, de a benzidrilamin gyantára Boc-Gly-OH helyett Boc-D-Ala-OH védett aminosavat kapcsolunk első aminosavként. Tisztítást a 2. példa szerint végezzük. $R_{f1} = 0,7$.

11. példa:***H-D-Trp¹-[Lys(ε-Fmoc)]⁸, D-Ala¹⁰-GnRH-III***

Mindenben az 1. példa szerint járunk el, de a GnRH-III szekvenciájában a BHA-gyantára első aminosavként Boc-D-alanint a 8-as helyzetű lizin esetében Boc-Lys(ε-Fmoc)-OH védett aminosavat, végül a dekapeptid N-terminálisára Boc-D-Trp-OH védett aminosavat kapcsolunk:

A tisztítást az 1. példa szerint Seph G-25 oszlopon végezzük. Az intermedier származékot az 1. példa szerint gradiens elúcióval tisztítjuk.

12. példa:***Ac-D-Trp¹, D-Ala¹⁰-GnRH-III***

A 11. példa szerint előállított védett Peptid-BHA-gyantáról a Boc-csoportot az 1. példa szerint eltávolítjuk, majd a szabad amino terminusú peptidet – BHA-gyantát – ecetsavanhidridimadzol eleggyel acetilezzük. Ezután cseppfolyós HF-el az 1. példa szerint a gyantáról a cím szerinti peptidet hasítjuk, az Fmoc

védőcsoportot a 6. példa szerint lehasítjuk, a terméket a 2. példa szerint tisztítjuk. $R_{f1} = 0,8$, $R_{f2} = 0,36$.

13. példa:***H-D-Trp¹, D-Ala¹⁰-GnRH-III***

A 11. példa szerint előállított védett intermedier peptidről a 6. példa szerint eltávolítjuk az Fmoc védő csoportot és a nyers tisztítást a 2. példa szerint végezzük. $R_{f1} = 0,55$, $R_{f2} = 0,28$.

14. példa:***(Trp(For-Ind))^{3,7}-GnRH-III***

Az 1. példában leírt módszert alkalmazzuk, és a GnRH-III szekvenciában a 8-as helyzetben Boc-Lys(ε-Z)-OH, 3-, és 7-es helyzetben Boc-Trp(For-Ind)-OH védett aminosav származékot használunk. Tisztításokat az 1. példa szerint végezzük. $R_{f1} = 0,68$, $R_{f2} = 0,03$.

15. példa:***Phe⁷-GnRH-III***

Mindenben az 1. példa szerint járunk el, de a GnRH-III szekvenciában a 7-es helyzetben Boc-fenilalanint használunk. A tisztításokat az 1. példa szerint végezzük. $R_{f1} = 0,65$.

16. példa:***GnRH-III(1-9)-etil-amid***

1,46 mMol Boc-Pro-Merrifield gyantából kiindulva a GnRH-III szekvenciájának megfelelően kapcsoljuk a védett aminosavat, az 1. példa szerint. Az oldalláncokon védett peptidet 20 térfogat%-os etilamin-dimetilformamid oldattal hasítjuk a gyantáról 48 óráig +10 °C-on kevertetve. $R_{f2} = 0,5$

A dimetilformamidot vákuumban bepároljuk és a maradékot éterrel eldörzsöljük. A nyers, védett peptidről az oldallánc védőcsoportokat az 1. példa szerint cseppfolyós hidrogénfluoriddal távolítjuk el. A nyers 16. sz. peptidet Sephadex G-25 oszlopon, majd középnyomású kromatografiával tisztítjuk. Tömege: 215 mg, $R_{f1} = 0,72$.

17. példa:***Lys⁵, D-Trp⁶-hGnRH***

0,5 mMol BHA gyantából kiindulva az 1. példa szerinti módszerrel a humán GnRH aminosav sorrendjének megfelelően, de a 6-os helyzetben Boc-glicin helyett Boc-D-Trp-OH és az 5-ös helyzetben Boc-L-Tyr(Bzl)-OH helyett Boc-L-Lys(ε-Z)-OH védett aminosavakat használunk a szintézishez. Tisztítás Sephadex G25-ön az 1. példa szerint.

Gradiens elúció:

A: 0,05 Mol ammóniumacetát (pH = 4,00) – metanol 30–70

B: 0,05 Mol ammóniumacetát (pH = 4,00) – metanol 30–70

Gradiens elúció 400–400 ml

Liofilizáltuk 3-szor az ammóniumacetát eltávolítása miatt.

Tömege: 52 mg. $R_{f2} = 0,34$, $R_{f1} = 0,21$.

18. példa:

Lys⁴,D-Trp⁶-hGnRH

Az 1. példa szerinti módszert alkalmazzuk a hGnRH aminosav sorrendjének megfelelően, de a 6-os helyzetben Boc-glicin helyett Boc-D-Trp-OH, a 4-es helyzetben Boc-L-Ser(Bzl)-OH helyett Boc-L-Lys(ε-Z)-OH védett aminosav származékot használunk. A termék tisztítását is a 17. példa szerint végezzük. A tisztta termék tömege: 60 mg. $R_{f1} = 0,25$.

19. példa:

H-Glu¹,D-Trp⁶-hGnRH

Az 1. példa szerinti módszert alkalmazzuk a hGnRH aminosav sorrendjének megfelelően, de a 6-os helyzetben Boc-glicin helyett Boc-D-Trp-OH, az 1-es helyzetben pyroglutaminsav helyett Boc-L-Glu(O Chx)-OH védett aminosavszármazékot használunk. A termék tisztítását a 17. példa szerint végezzük, de az ammóniumacetátoros gradiens elúció után még egy sótalanítási lépést iktatunk be a következők szerint. Gradiens elúciót alkalmazunk MPLC oszlopon:

A oldat: 20 térfogat%-os ecetsav

B oldat: A oldat : izopropanol = 3 : 1 elegye,
300 ml A – 300 ml B

A tisztta frakciókat gyűjük és liofilizáljuk.

Tömege: 53 mg $R_{f1} = 0,29$, $R_{f2} = 0,19$.

20. példa:

Lys⁵, D-Phe⁶-hGnRH(1-9)-etilamid

A 16. példa szerint Boc-Pro-Merrifield gyantából indulunk ki, de a szintézisnél a humán GnRH szekvenciája szerint végezzük a szintézist, kivéve, hogy a 6-os helyzetben Boc-D-Phe-OH, 5-ös helyzetben Boc-Lys(ε-Z)-OH védett aminosavakat használunk. A peptidet a gyantáról úgy hasítjuk, hogy etilaminban 0 °C-on 8 órán át kevertejük, majd egy éjjelen át szobahőmérsékleten; közben az etilamin elpárolog. Ezután metanol-dimetülfiformamidos mosással a védett nonapeptid-etilamidot a gyantáról leoldjuk. Bepároljuk a nyert oldatot. Éterrel eldörzsölve megszilárdítjuk. A nyert terméket cseppfolyós HF-el kezeljük az 1. példa szerint, majd a terméket a 2. példa szerint HPLC módszerrel tisztítjuk. $R_{f1} = 0,81$, $R_{f2} = 0,36$.

21. példa:

Lys⁴, D-Phe⁶-hGnRH(1-9)-etilamid

Mindenben a 20. példa szerint járunk el, de ebben az esetben a 4-es helyzetben használunk Boc-Lys(ε-Z)-OH védett aminosavat. $R_{f1} = 0,8$, $R_{f2} = 0,4$.

22. példa

Lys⁴, D-Cpa⁶-hGnRH(1-9)-etilamid

Mindenben a 20. példa szerint járunk el, de ez esetben a 6-os helyzetben Boc-D-Phe-OH helyett Boc-D-Cpa-OH védett aminosavat használunk. $R_{f1} = 0,83$, $R_{f2} = 0,37$.

AZ IN VITRO KISÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT HUMÁN SEJTVONALAK

Az MCF-7 emberi emlődaganat sejtvonalat Soule és mtsai stabilizálták 1973-ban emlőrákos beteg pleu-

ra folyadékából. Az MDA-MB-231 emberi emlődaganat sejtvonalat 1974-ben Cailleau és mtsai ugyancsak pleurális folyadékból izolálták és stabilizálták. Mindkét sejtvonal monolayerben nő. Az MCF-7 és MDA-MB-231 humán emlődaganat sejtvonalakat műanyag flaskában (Greiner), Dulbecco- módosított Eagle-MEM (DMEM, GIBCO) tápfolyadékban tartjuk fenn. A tápfolyadék 10% újszülött borjúsavot (10% FCS) tartalmaz.

10 Az MCF-7 sejtvonal ösztradiol receptor (ER)-pozitív és GnRH-t specifikusan kötő fehérjéket tartalmaz (Vincze, B., Pályi, I., Kremmer, T., Számel, I., Sugár, J., Mező, I., Seprődi, J., Teplán, I., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 427 (1990); Vincze, B., Pályi, I., Prajda, N., Daubner, D., Kálnay, A., Mező, I., Seprődi, J., Teplán, I. Cell Proliferation, 25, 518 (1992)) így alkalmas modellrendszer a GnRH receptor által közvetített direkt hatásának tanulmányozására.

20 Az MDA-MB-231 sejtvonal ER-negatív és GnRH receptor-pozitív, szintén alkalmas a GnRH direkt hatásának vizsgálatára. A PC3 emberi prosztata carcinoma sejtvonalat Kaighn és mtsai stabilizálták sejtenyészetben, 1979-ben. A sejtek hámtípusúak, és kompakt telepeket képeznek telepképző vizsgálatokban. Az Ishikawa sejtvonal emberi endometrium adenocarcinomából származik (Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. Acta Obstet Gynecol Jpn. 37, 1103-1111 (1985)), hám-jellegű, és szteroid, valamint GnRH-receptort tartalmaz.

30 **A. példa**
DÓZIS-TÚLÉLÉS VIZSGÁLATOK GnRH ANALÓG KÉSZÍTMÉNYEKKEL MCF-7, MDA-MB-231 EMBERI EMLŐ-, PC3 PROSZTATA-, ÉS ISHIKAWA ENDOMETRIUM-DAGANAT SEJTENYÉSZETEKEN

35 A vizsgálat pontos tájékoztatást ad a vizsgált anyag sejtkárosító hatásáról, a változó dózis függvényében. A kezelés egy alkalommal történik, és a túlélő sejtekből képződött telepeket 8–12 nap múlva számoljuk. Hormonok esetében az anyagok általában nem toxikusak, nagy előnyük viszont, hogy sejt-, ill. receptor specifikusak. A GnRH analógok fázis-specifikusan hatnak. a sejteket GO/G1 fázisban blokkolják, de nem pusztítják el. Az arretált sejtek egy része ismét ciklusba megy, más része elpusztulhat (apoptózis). Az arretált sejtekből képződött telepek a telepszámolás napján nem érik el a számolható telepnagyságot (a telepszám lehet azonos, de a telepnagyság nem). A dózis-válasz vizsgálat 40 esetében az alacsony sejtszámból álló telepeket (10-15) nem vesszük számításba.

45 3,5 cm átmérőjű Petri csészébe 300-300 sejtet ültetünk. A kezelést egy alkalommal végezzük a kiültetés után 24 órával, majd a képződött telepeket 8–12 nap múlva számoljuk. A sejteket 1–50 μ M 2., 3., 6., 7., 8., 14., 15., és 17. számú GnRH analóg készitményekkel, ill. 1–50 μ M GnRH-III-mal kezeljük. Az 1. táblázatban az MCF-7, MDA-MB-231, PC3, Ishikawa sejtekben elérő gátlás százalékát adjuk meg, az alkalmazott hatóanyag dózisát feltüntetve.

Vizsgálataink alapján a már ismert szintetikus GnRH-III peptid készítmény 50 μM dózisban alkalmazva, 45%-os, ill. 49%-os telepképződés-gátlást eredményezett az MCF-7, ill. az MDA-MB231 sejtnevések esetében. Ilyen szignifikáns gátlást még egyetlen GnRH agonista (Ovurelin, Buserelin), sőt GnRH antagonistá (MI-1544) esetében sem kaptunk. Ugyanakkor az GnRH-III az Ishikawa sejtvonálat nem gáolta az alkalmazott dózistartományon belül, és a PC3 prosztata sejtkultúrán is csak 21%-os telepképződés-gátlást eredményezett. A GnRH-III készítmény hatását a találomány tárgyát képező 17-es készítmény haladta meg, mely MCF-7 esetében 65%-os, MDA-MB-231 esetében 63%-os gátlást eredményezett (1. táblázat). MCF-7 emlődaganat sejtkultúra esetében a 3, 6, 7 és 8-as GnRH-III analóg készítmények 50 NM dózisban alkalmazva 40-52%-os telepképződés gátlást eredményeztek (1. táblázat). MDA-MB-231 emlődaganat sejtkultúrán a 17-es készítményt követően a 6-os és 7-es készítmény bizonyult a leghatékonyabbnak (35-42%) (1. táblázat). PC3 prosztatadaganat sejtkultúrán végzett vizsgálatok alapján a legjelentősebb gátlást a 8-as készítmény eredményezte (31%) 50 μM dózisban alkalmazva. A 6-os és 7-es készítmény az alkalmazott dózistartományon belül nem befolyásolta, a 17-es készítmény gyengén gáolta a PC3 sejtvonai telepképző képességét (1. táblázat). Ishikawa endometriumdaganat sejtkultúra esetében az 50 μM dózisban alkalmazott 3-as készítmény 13%, a 6-os 21%, az 7-es 14%, a 8-as 2%, a 17-es 15% és a 14-es 24%-os telepképződés gátlást okozott.

Vizsgálatainkhoz kontrollként a tumorterápiában használatos DTrp⁶-hGnRH (Sigma) analógot használjuk. Az 1. táblázat adataiból kitűnik, hogy a vizsgált analógjainak közül a 2. és 15. analóg egyáltalán nem, vagy csak gyenge hatást mutatott. A 14. és 19. analóg megközelítette a kontrol aktivitását. A többi analóg (3., 6., 7., 8.) meghaladta a kontroll gátló hatását, míg a 17. analóg kb. kétszeres gátlást mutatott.

B. példa

HUMÁN DAGANATSEJTVONALAK SEJTSZTÓDÁSÁNAK GÁTLÁSA

Az in vitro kezelés menete: A sejteket tripszíneztük, majd 10 cm átmérőjű Petri-csészébe 300 000 MCF-7, MDA-MB-231, PC3 vagy Ishikawa sejyet passzáltunk. A kiültetést követő naptól számítva, a sejteket az exponenciális növekedési fázisban kezeltük 1-50 μM GnRH analóg készítménnyel. Az öt napos vizsgálat során két naponta kezeltük a sejteket tápfolyadékban oldott peptidhormonnal, majd a hatodik napon meghatároztuk a sejtszámot.

A GnRH-III sejtosztódás-gátló hatása 30 μM dózis esetében 35-40%-os volt mind az MCF-7, mind az MDA-MB-231 sejtek esetében. Előzetes vizsgálataink alapján a hGnRH agonista Ovurelin ill. Buserelin hat napos kezelést követően az MCF-7 ER-positív sejtvonai esetében nem okozott jelentős sejtszámváltozást (5-15%-os gátlás), az MDA-MB-231 ER-negatív sejtvonai esetében viszont 25-30%-os sejtproliferáció-gátlást eredményezett.

A GnRH-III sejtosztódás-gátló hatása 30 μM dózis esetében megegyezik az ismert GnRH antagonisták (több D aminosavat tartalmazó emlős GnRH származékok, MI-1892 és MI-1544) direkt daganatgátló hatásával minden emlődaganat sejtvonalon (2. táblázat).

A 6-os és 7-es anyag sejtosztódás gátló hatása közel azonos (27-31%) a számos D-aminosavat tartalmazó GnRH antagonisták (MI-1544, MI-1892, SJ-1004) direkt proliferáció gátló hatásával (2. táblázat).

Mint a 2. táblázat mutatja az anyagok proliferáció gátló hatása a 15-ös anyag kivételével bizonyos szórásban belül megegyezik a telepképződés gátlás eredményeivel. Több éves vizsgálat tapasztalatunk alapján szoros korreláció van a telepképződés gátlás és az anyagok in vivo hatása között is.

A biológiai vizsgálatokban összehasonlító anyagként felhasznált, már ismert peptidek összetétele a következő:

MI-1892:

Ac-D-Trp^{1,3},D-Cpa²,Lys⁵,[β -Asp(DEA)]⁶,D-Ala¹⁰-

20 hGnRH

(Magyar Szabadalmi bejelentés: P.93-00853)

MI-1544:

Ac-D-Trp^{1,3},D-Cpa²,D-Lys⁶,D-Ala¹⁰-hGnRH

(Kovács, M., Mező, I., Flerkó, B., Teplán, I., Nikolics, K. BBRC, 118, 351-355 (1984); Kovács, M., Mező, I., Seprődi, J., Csernus, V., Teplán, I., Flerkó, B., Peptides, 10, 925-931 (1989).

SJ-1004:

D-Phe²,D-Trp³,D-Lys⁶-hGnRH

30 GnRH-III:

pGlu-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

Decapeptil:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-

NH₂

1. táblázat

TELEPKÉPZÉS GÁTLÁSÁNAK MÉRTÉKE KÜLÖNBÖZŐ HUMÁN DAGANATSEJTVONALAKON

	Példa sorszáma	Sejtvonai	Dózis	Gátlás
40	2. Lys ⁵ -GnRH-III	MCF-7 MDA-MB-231	50 μM 50 μM	0% 0%
45	3. Lys ⁵ -cyclo-(Asp ⁶ .Lys ⁸)-GnRH-III	MCF-7 Ishikawa	50 μM 50 μM	44% 13%
50	6. Lys ⁴ -GnRH-III	MCF-7 MDA-MB-231 Ishikawa PC3	10 μM 50 μM 10 μM 50 μM 50 μM 50 μM	15% 40% 18% 35% 21% 0%
55	7. [Lys(ϵ -Ac)] ⁴ -GnRH-III	MCF-7 MDA-MB-231 Ishikawa PC3	10 μM 50 μM 10 μM 50 μM 50 μM 50 μM	40% 52% 31% 42% 14% 0%
60				

Példa sorszáma	Sejtvoná	Dózis	Gátlás
8. Glu ⁶ -GnRH-III	MCF-7 MDA-MB-231 Ishikawa PC3	50 µM 50 µM 50 µM 50 µM	44% 25% 2% 31%
17. Lys ⁵ -DTrp ⁶ -hGnRH	MCF-7 MDA-MB-231 Ishikawa PC3	10 µM 50 µM 10 µM 50 µM 50 µM 50 µM	39% 65% 30% 63% 17% 18%
14. [Trp(For-Ind)] ^{3,7} -GnRH-III	MCF-7 Ishikawa	50 µM 50 µM	31% 24%
15. (Phe ⁷)-GnRH-III	MCF-7 MDA-MB-231	50 µM 50 µM	26% 21%
19. H-Glu ¹ , D-Trp ⁶ -hGnRH	MCF-7	10 µM 50 µM	16,8% 32,7%
D-Trp ⁶ -hGnRH (Decapeptil)	MCF-7 MDA-MB-231	10 µM 50 µM 10 µM 50 µM	17,1% 36,7% 15,7% 38,7%

2. táblázat

GnRH ANALÓG SEJTSZTÓDÁS GÁTLÁSÁNAK MÉRTÉKE KÜLÖNBÖZŐ HUMÁN DAGANATSEJT-VONALAKON

Példa sorszáma	Sejtvoná	Dózis	Gátlás
MI-1544	MCF-7 (2x)	30 µM	36%
	MDA-MB-231 (2x)	30 µM	34%
	Ishikawa (2x)	30 µM	8%
	PC3 (2x)	30 µM	24%
MI-1892	MCF-7 (2x)	30 µM	35%
	MDA-MB-231 (2x)	30 µM	35%
	Ishikawa (2x)	30 µM	14%
	PC3 (2x)	30 µM	33%
SJ-1004	MCF-7 (2x)	30 µM	17%
	MDA-MB-231 (2x)	30 µM	23%
	Ishikawa (2x)	30 µM	8%
	PC3 (2x)	30 µM	10%
6. Lys ⁴ -GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 µM	27%
	MDA-MB-231 (2x)	30 µM	28%
7. Lys(ε-Ac) ⁴ -GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 µM	31%
8. Glu ⁶ -GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 µM	18%
15. Phe ⁷ -GnRH-III GnrH-III	MCF-7 (2x)	30 µM	40%
	MDA-MB-231 (2x)	30 µM	39%
	PC3 (2x)	30 µM	10%
	Ishikawa (2x)	30 µM	8%

MCF-7 = humán eredetű emlő tumor sejtvoná

MDA-MB-231 = humán eredetű emlő tumor sejtvoná

PC3 = humán eredetű prosztata tumor sejtvoná

Ishikawa = humán eredetű endometrium tumor sejtvoná

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az X-R¹-R²-R³-R⁴-R⁵-R⁶-R⁷-R⁸-Pro-R¹⁰-Y(I) általános képletű vegyületek és gyógyászatilag elfogadható sóik, ahol X jelentése hidrogénotom, acetilcsoport, vagy propionilcsoport, ha R¹ jelentése pGlu-tól eltérő; vagy intramolekuláris savarnidkötés, ha R¹ jelentése pGlu; R¹ jelentése pGlu, Glu, D-Trp, vagy D-Phe; R² jelentése His, vagy D-Phe; R³ jelentése adott esetben az indolil csoportján védeült L-, vagy D-Trp; R⁴ jelentése Ser, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védeült Lys; R⁵ jelentése Tyr, vagy az ε-aminocsoportján adott esetben védeült Lys, vagy His; R⁶ jelentése Asp, Glu, D-Trp, D-Phe, vagy D-Cpa; R⁷ jelentése Phe, Leu, vagy N-Me-Leu, vagy adott esetben az indolil csoportján védeült L-Trp; R⁸ jelentése az ε-aminocsoportján adott esetben védeült Lys; Arg, valamint ha R⁶ jelentése Asp, és R⁸ jelentése Lys, akkor e két szubsztituens a Lys-csoport ε-aminocsoportján keresztül intramolekuláris gyűrűt képezhet; R¹⁰ jelentése Gly, D-Ala vagy vegyértékvonal; és Y jelentése OH vagy NH₂ csoport, ha R¹⁰ jelentése Gly vagy D-Ala, és etil-amid-csoport, ha R¹⁰ jelentése vegyértékvonal.

2. Az 1. igénypont szerinti [Lys(ε-Fmoc)]⁵-GnRH-III, Lys⁵-GnRH-III, Lys⁵,cyclo[Asp⁶-Lys⁸]-GnRH-III, Lys⁵,[Lys(ε-Fmoc)]⁸-GnRH-III, Lys⁴,[Lys(ε-Fmoc)]⁸-GnRH-III, Lys⁴-GnRH-III, [Lys(ε-Ac)]⁴-GnRH-III, Glu⁶-GnRH-III, cyclo[Asp⁶-Lys⁸]-GnRH-III, D-Ala¹⁰-GnRH-III, H-D-Trp¹, [Lys(ε-Fmoc)]⁸, D-Ala¹⁰-GnRH-III, Ac-D-Trp¹, D-Ala¹⁰-GnRH-III, H-D-Trp¹, D-Ala¹⁰-GnRH-III, [Trp(For-Ind)]^{3,7}-GnRH-III, Phe⁷-GnRH-III, GnRH-III(1-9)-etilamid, Lys⁵, D-Trp⁶-hGnRH, Lys⁴, D-Trp⁶-hGnRH, H-Glu¹, D-Trp⁶-hGnRH, Lys⁵, D-Phe⁶-hGnRH(1-9)-etilamid, Lys⁴, D-Phe⁶-hGnRH(1-9)-etilamid, vagy Lys⁵,D-Cpa⁶-hGnRH(1-9)-etilamid.

valamint ezek gyógyászatilag elfogadható sói.

3. Gyógyszerkészítmények, amelyek hatóanyagként az 1. igénypont szerinti (I) általános képletű vegyületeket, vagy gyógyászatilag elfogadható sóikat a gyógyszerkészítésben szokásosan alkalmazott segédanyagokkal együtt tartalmazzák.

4. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmények, amelyek hatóanyagként a 2. igénypont szerinti vegyületeket vagy sóikat tartalmazzák.

NOVEL GNRH ANALOGUES WITH ANTITUMOUR EFFECT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM AS ACTIVE AGENTS

1609

The invention relates to novel peptides possessing
5 antitumour effect as well as their salts and esters.

In addition to antiestrogens, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues play an important role in the treatment of hormone-dependent malignant tumours. Within the malignant neoplasms, the scope of their use extends to the
10 cancers of prostate, breast (mamma), endometrium and other hormone-dependent tumours. It is known that this factor of hypothalamic origin (a peptide hormone built up of 10 amino acids) is responsible for the secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH). A
15 number of agonistic and antagonistic analogues of GnRH-s proved to be not only useful for the successful influencing of processes of the reproduction biology but also suitable as antitumour drugs.

Recent publications report that GnRH analogues can
20 exert their antitumour effect not only through chemical castration but also in a selective way by directly acting on the tumour cells. The presence of receptor(s) specifically binding GnRH or GnRH analogues, respectively, as well as that of GnRH-mRNA were shown in cell cultures of cancers of human
25 mamma, prostate, ovary and pancreas [K. A. Eidene et al.: *Science* 229, 989-991 (1985); G. Emons et al.: *Gynecol. Endocrinol.* 1, Suppl. 2, 71 (1993); P. Limonta et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 797-800 (1993)]; furthermore, the *in vitro* proliferation-inhibiting action of GnRH analogues

was proven on the same cell lines [K. A. Eidene et al.: *Science* 229, 989-991 (1987); Y. Shiloni et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1648-1651 (1989)].

The specific binding of tritium-labelled D-Phe⁶-

5 -GnRH(1-9)-ethylamide (OVURELIN), a human GnRH superagonist, to cells of MCF-7 and MDA-MB-231 human mammary carcinoma cell lines was demonstrated in own experiments [Vincze et al.: *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 38, 119 (1991)]. In accordance with the literature [Y. E. Shiloni et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1648-1651 (1989); T. J. Segal-Abramson et al.: *Molec. Cell. Endocrin.* 85, 109-116 (1992)], these results confirm the presence of receptor(s) specifically binding GnRH analogues, which is a fundamental condition for development of a direct effect. Similarly, D-Trp⁶-hGnRH (DECAPEPTYL), an agonistic 15 analogue brought into the therapeutical practice, proved to possess a receptor on the MDA-MB-231 tumour cell line [Tetsu Yano et al.: *Breast Cancer Res. Treat.* 21, 35-45 (1992)] and a direct growth-inhibiting effect on the human mammary tumour cell line mentioned above [Y. Shiloni et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86, 1658-1651 (1989); as well as C. Néri et al.: *Breast Cancer Res. Treat.* 15, 85-93 (1990)].

Based on the effective concentration it can be supposed that low-affinity binding site or sites may play an important role in the development of direct antitumour effect.

25 According to the literature the direct antitumour action of GnRH analogues occurs only at relatively high peptide concentrations (10^{-6} - 10^{-5} M) [Y. Shiloni et al.: (1989); W. N. Scott et al.: *Eur. J. Cancer* 27, 1458-1461

(1991); B. Vincze et al.: J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 38, 119-126 (1991); T. Segal-Abramson et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 2336-2339 (1992)]. This pharmacological effect can be achieved only in the case when the active molecule is 5 present in the body not only in a high concentration but also for a long time [A. V. Schally in: P. Belford et al. (editors): General Gynecology Vol. 6, pages 3 to 22, Parthenon Publishing, Carnforth, England (1989); as well as K. Bokser et al.: J. Reprod. Fertil. 85, 569-579 (1989)].

10 For a long time, GnRH was not believed to be a species-specific hormone; it has become known as late as in the early 80's that the structure of gonadoliberin of some fish and bird species, respectively, is different from that of the mammals [J. A. King and R. P. Millar: J. Biol. Chem. 257, 15 10722-10728 (1982); N. Sherwood et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2794-2798 (1983)]. In comparison to the mammalian GnRH, the structure of fish- and bird-specific GnRH, respectively, differs in the amino acid position(s) 7 and/or 8. In relation to the release of LH and FSH, 20 respectively, of mammals, the analogues of chicken GnRH or salmon GnRH are not hyperactive and therefore, they do not desensitize the gonadotropic cells of hypophysis in the corresponding dose range. The composition of mammalian, e.g. human, GnRH is as follows: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- 25 -Pro-Gly-NH₂.

In 1993 the researchers of the Creighton University Medical School, Omaha isolated and then synthesized the Lamprey-III-GnRH decapeptide from lamprey (*Petromyzon*

marinus) (pGly-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂). Now, it has been found that Lamprey-III-GnRH (hereinbelow abbreviated: GnRH-III) exerts a significant tumour growth-inhibiting effect on human mammary tumour cell lines mentioned 5 above. Simultaneously, on investigating the endocrinological effect of GnRH-III on rat hypophysis by using the superfusion method it has been found that the LH-releasing effect of this hormone is about thousand times weaker than that of the human GnRH. In the course of in vivo investigations it has been 10 found that, during a prolonged treatment for three cycles, it did not inhibit the ovulation of female rats even in high doses; therefore, it did not induce desensitisation and chemical castration. In relation thereto, a "flare up" tumour growth occurring at the beginning of treatment did not appear 15 on the tumour-bearing animals in contrast to other known human hormone analogues acting through the same mechanism of action.

From these investigations it was concluded that GnRH-III is a selective, highly active antitumour compound, for which 20 patent protection has been claimed in the United States patent application No. ...

The aim of the present invention is to prepare analogues of human GnRH (hGnRH) and Lamprey GnRH-III showing antitumour effect in human tumour cell cultures.

25 This aim was solved by the preparation of peptides of general formula (I) as well as their pharmaceutically acceptable salts and esters.

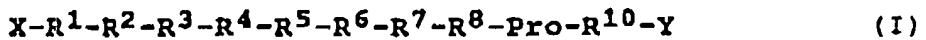
The invention is based on the recognition that these

compounds exert a direct antitumour action against human tumour cells. Unexpectedly, compounds containing only natural L-amino acids also show a direct antitumour effect. Namely, antitumour GnRH analogues known at present contain at least 5 one of non-natural D-amino acids in the case of agonists and usually several non-natural D-amino acids in the case of antagonists.

Furthermore, it has been recognized that for more amino acid groups of antitumour GnRH analogues Lys groups may be 10 substituted without any decrease in the favourable antitumour effect of the molecule. This is advantageous since, through the ϵ -amino group of Lys, the peptide can be connected to suitably selected larger molecules containing an acylating group. In this case, the macromolecules may be carrier 15 molecules of the peptide and can thereby promote the maintenance of a steady, high level of the GnRH analogue in the body.

The invention relates to the peptides of general formula (I),

20



wherein

X means hydrogen, acetyl group or propionyl group when R^1 25 is different from pGly^u; or an intramolecular acid amide bond when R^1 stands for pGlu;

R^1 stands for pGlu, Glu, D-Trp, D-Cpa, D-Nal or D-Phe;

R^2 means His, D-Phe or D-Cpa;

R³ represents D-Cpa, D-Pal or L- or D-Trp optionally protected on the indolyl moiety;

R⁴ stands for Ser; or Lys optionally protected on the ϵ -amino group;

5 R⁵ means Tyr; or Lys optionally protected on the ϵ -amino group; or His;

R⁶ stands for Asp, Glu, D-Lys and optionally ϵ -amino-methylated derivatives thereof; as well as D-Trp, D-Phe, D-Leu, D-Ala, D-Cpa or D-Arg;

10 R⁷ represents Phe, Leu or N-Me-Leu; or L-Trp optionally protected on the indolyl moiety;

R⁸ means Lys optionally protected on the ϵ -amino group; Arg, Gln; or R⁶ and R⁸ together can form an intramolecular ring through the ϵ -amino group of Lys when R⁶

15 is Asp and R⁸ means Lys;

R¹⁰ stands for Gly, D-Ala or a valence bond; and

y represents OH or NH₂ group when R¹⁰ means Gly or D-Ala; or an ethylamide group when R¹⁰ means a valence bond, as well as the pharmaceutically acceptable salts and/or

20 esters of these compounds.

The invention furthermore relates to pharmaceutical compositions containing the peptide of general formula (I) and/or pharmaceutically acceptable salts and/or esters thereof.

25 The abbreviations used in the description agree with the nomenclature accepted in the peptide chemistry and published in J. Biol. Chem. 241, 527 (1966); 247, 977 (1972); furthermore, D-Nal stands for β -(2-naphthyl)-D-alanine, D-Cpa means

p-chlorophenyl-D-alanine and D-Pal stands for β -(3-pyridyl)-D-alanine. When not noted otherwise, all amino acids named in the description are in L-configuration.

In the peptides according to the invention the preferred protective group of the indolyl moiety of Trp is Fmoc; the preferred protective group of the ϵ -amino group of Lys is Fmoc.

The pharmaceutically acceptable salts of the peptides of general formula (I) are acid-addition salts formed with pharmaceutically acceptable organic or inorganic acids, e.g. acetates or hydrochlorides.

The compounds of general formula (I) can be prepared in liquid phase by using methods known in the peptide chemistry (by condensations carried out in the defined sequence of suitably protected amino acids or fragments prepared therefrom) or - in a particularly preferable way - by using the solid-phase peptide synthesis. A peptide obtained in the form of its salt can be converted to an other salt in a known manner. If desired, the ester groups of ester compounds obtained may be cleaved.

The peptide of general formula (I) may be administered mainly in the form of injectable solutions, infusions or intranasal compositions. Being decomposed in the digestive system, they cannot be administered orally in themselves but may be administered in any other route. The injections may be given in intramuscular, intravenous or subcutaneous route.

The active agents of general formula (I) can be formulated to pharmaceutical compositions by using known

methods of the pharmaceutical techniques. The active agent can be transformed also to compositions with prolonged action (e.g. in the form of microcapsules or microgranules) in the usual way. In addition to the active agent, auxiliaries 5 commonly used in the pharmaceutical industry such as a liquid vehicle useful for injection purposes (isotonic saline or phosphate buffer solution) may be used. If necessary, the compositions may contain stabilizers (e.g. ascorbic acid), too.

The preparation of peptides according to the invention 10 is illustrated by the following Examples.

The chemical purity and identification of both intermediary and final products were controlled by using thin-layer chromatography (TLC); those of the final products were examined by means of HPLC chromatography, too.

15 The thin-layer chromatography values were determined on Kieselgel sheets (DC Alufolien, Merck) by using the following solvent mixtures:

1.	Ethyl acetate/pyridine/water/acetic acid	15:20:6:11
2.	Ethyl acetate/pyridine/water/acetic acid	30:20:6:11
20 3.	Ethyl acetate/pyridine/water/acetic acid	60:20:6:11
4.	Ethyl acetate/pyridine/water/acetic acid	120:20:6:11
5.	Ethyl acetate/pyridine/water/acetic acid	240:20:6:11
6.	n-Butanol/acetic acid/water	4:1:1
7.	n-Butanol/acetic acid/water	4:1:2

25 The side chains of protected amino acids are protected by a benzyl group in the case of Tyr and Ser; by a (benzyl-oxy)carbonyl (Z) group or a 9-fluorenyl(methoxycarbonyl) (Fmoc) group for preparing an intermediary peptide analogue

in the case of Lys; by a tosyl (Tos) group in the case of Arg and His; and by a cyclohexyl (chx) group in the case of carboxy groups of Asp and Glu.

The invention is illustrated in more detail by description of the preparation process of the preferred analogues listed hereinbelow:

1. $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^5\text{-GnRH-III}$,
2. $\text{Lys}^5\text{-GnRH-III}$,
3. $\text{Lys}^5\text{, cyclo[Asp}^6\text{-Lys}^8\text{]-GnRH-III}$,
- 10 4. $\text{Lys}^5\text{, }[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
5. $\text{Lys}^4\text{, }[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
6. $\text{Lys}^4\text{-GnRH-III}$,
7. $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Ac})]^4\text{-GnRH-III}$,
8. $\text{Glu}^6\text{-GnRH-III}$,
- 15 9. $\text{cyclo[Asp}^6\text{-Lys}^8\text{]-GnRH-III}$,
10. $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
11. $\text{H-D-Trp}^1\text{, }[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{, D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
12. $\text{Ac-D-Trp}^1\text{, D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
13. $\text{H-D-Trp}^1\text{, D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
- 20 14. $[\text{Trp(For-Ind)}]^3,7\text{-GnRH-III}$,
15. $\text{Phe}^7\text{-GnRH-III}$,
16. $\text{GnRH-III(1-9)-ethylamide}$,
17. $\text{Lys}^5\text{, D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
18. $\text{Lys}^4\text{, D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
- 25 19. $\text{H-Glu}^1\text{, D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
20. $\text{Lys}^5\text{, D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$,
21. $\text{Lys}^4\text{, D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$,
22. $\text{Lys}^5\text{, D-Cpa}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$.

On investigating the capacity factor of some analogues of high importance by using HPLC the following results were obtained:

5	Analogue	k'	Methanol
	<u>Example No.</u>		<u>%</u>
	3	3.57	38
	5	9.28	55
	6	3.57	30
10	7	11.57	30
	8	7.57	30
	17	9.57	38
	19	14.10	38
	19	8.71	40

15

ISCO model 2350 pump 1 ml/min, ISCO V4 detector (215 nm).

Column: BST, ODS Hypersil 5 μ m, 270 x 4 mm.

Eluent: MeOH/0.1 M NaH₂PO₄ (pH = 2.22).

20

$$k' = \frac{T_R - t_0}{t_0}$$

The invention is illustrated in more detail by the
25 following non-limiting Examples.

Example 1

Preparation of [Lys(ϵ -Fmoc)]⁵-GnRH-III

The peptide is prepared on a benzhydrylamine resin (of 0.65 milliequivalent/g capacity) by using an automatic peptide synthetizer. The protected amino acid Boc-glycine is

used in an excess of three equivalents calculated for the capacity of the resin; DIC as condensing agent and HOBr as catalyst are employed in amounts equivalent to the protected amino acid. The coupling of Boc-Gly-OH to the resin lasts for 5 12 hours. Thereafter, the completion of coupling to the resin is controlled by means of ninhydrin reaction of the resin/protected amino acid compound. The coupling to the resin of Boc-Gly-OH is usually complete in the first coupling; if in some cases the ninhydrin reaction gives a positive result 10 (indicating that the amino groups of the benzhydrylamine resin are not fully substituted), the coupling to the resin can be made complete by using the symmetric anhydride method. (Based on the weight increase, the capacity of the resin amounts to 75-80 % of the capacity value given by the 15 manufacturing company.)

After ~~cleaving~~ ^{deprotecting} and neutralizing the Boc-Gly-BHA resin in the usual way, the peptide synthesis is carried out step-wise according to the following scheme:

		<u>Minutes</u>
20	1. washing 3 times with dichloromethane	2
	2. cleavage once with a mixture of 1:2 ratio by volume of TFA and dichloromethane	2
	3. cleavage once with a mixture of 1:2 ratio by volume of TFA and dichloromethane	25
25	4. washing 3 times with dichloromethane	2
	5. washing 3 times with ethanol	2
	6. washing 3 times with chloroform	2

7.	neutralization twice with a mixture of 1:9 ratio by volume of triethylamine and chloroform	3
8.	washing twice with chloroform	2
9.	washing 3 times with dichloromethane	2
5 10.	addition of Boc-amino acid	-
11.	coupling once with diisopropylcarbodiimide	120-300
12.	washing twice with dichloromethane	2
13.	washing with ethanol	
10	On cleaving the Boc protective group, a mixture of 0.5 % by weight of indole with 0.2 % by volume of thioanisole or a mixture of 2 % by volume of anisole with 0.2 % by weight of L-methionine is employed for preventing side reactions.	

Protected amino acids are usually coupled by employing the carbodiimide method, but BOP reagent is used for bulky 15 amino acids (with high steric demand) (e.g. Leu, Trp, Cpa). In the case of a positive ninhydrin reaction, the coupling is carried out with symmetric anhydride after carbodiimide coupling; or with BOP reagent after BOP-reagent coupling.

In the course of the synthesis, a dimethylformamide 20 (DMF) solution containing a three-fold excess of Boc-amino acid, molar ratio of DIC coupling agent and HOBT catalyst calculated for 0.5 mmol of BHA resin are used in an order according to the sequence. In the present Example, Boc-L-Lys(ε-Fmoc)-OH protected amino acid is used as amino acid in 25 position 5.

The protective groups of the side chains and the peptide are removed from the resin by liquid HF in such a way that 0.25 mmole of peptide - BHA resin is maintained in 20-25 ml of HF in

the presence of 2.5 ml of 10 % by weight of p-cresol containing anisole and 100 mg of dithiothreitol at 0 °C for 1 hour. After removing HF under reduced pressure and treating the residue with absolute diethyl ether, the peptide is dissolved from the solid residue in a 15-33 % by volume acetic acid solution. In the present case, the hydrofluoride salt of the peptide is purified by gel filtration on Sephadex G-25 column in 33 % by weight acetic acid to obtain 360 mg of crude product with a chemical purity of 85 %; $R_f 2 = 0.5$.

10 Subsequently, the peptide is purified by using medium-pressure liquid chromatography (MPLC) on C_{18} reverse-phase silica gel column with gradient solutions.

Example 2

Preparation of Lys⁵-GnRH-III

15 After dissolving 240 mg of crude intermediary peptide derivative in 10 ml of DMF-water mixture of 1:1 ratio, 2 ml of piperidine are added while stirring and cooling with ice-water. After 2.5 hours the mixture is evaporated and the residue dissolved in 33 % acetic acid and purified on a 20 Sephadex G-25 column. The fractions are investigated by means of TLC and the main product is collected. The crude product is purified by using MPLC procedure.

Conditions:

Charge of the column: Prepex C-18 (25-40 μ , Phenomenex, USA)

25 Column: 400 mm (in length) x 25 mm (in diameter)

Eluent A: 70 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution (pH 4.00) and 30 % by vol. of methanol

B: 50 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution

(pH 4.00) and 50 % by vol. of methanol.

The elution is carried out by gradient elution with an eluent composed of solutions A and B.

The pure main fraction is collected, then made free

5 from salts and purified by carrying out gradient elution on the above column.

Eluent: A: 10 % acetic acid 400 ml

B: a 80:20 mixture of A and isopropanol 400 ml

The pure fractions are collected and the residue is 10 lyophilized to give 77 mg of the aimed product; $R_{f1} = 0.40$, $R_{f2} = 0.15$.

Example 3

Preparation of Lys⁵,cyclo[Asp⁶-Lys⁸]-GnRH-III

a) The crude intermediary peptide derivative (120 mg) 15 described in Example 1 is transformed to its hydrochloride salt by dissolving the peptide 1 in 6 ml of water and adding 2 ml of 0.1 N hydrochloric acid solution. After evaporation of the solution to dryness under reduced pressure, 102 mg of hydrochloride salt are obtained; $R_{f2} = 0.5$.

20 b) Cyclization

A solution containing 29 mg of peptide hydrochloride of step 3/a) in 25 ml of DMF is cooled to 0 °C and 200 μ l of 1 % sodium hydrogen carbonate solution are added. Simultaneously, 10 mg of BOP reagent and 10 mg of 1-hydroxybenzotriazole are 25 dissolved in 5 ml of DMF and added slowly, portionwise to the above aqueous solution. Subsequently, from a stock solution containing 170 μ l of diisopropyl ethylamine (DIEA) and 5 ml of DMF, 200 μ l are added to the reaction mixture which is

then stirred at room temperature overnight. The intermediary peptide formed ($R_f 2 = 0.6$) is subjected to the next transformation without isolation.

c) Removal of the Fmoc group

5 After evaporating the reaction mixture 3/b) under reduced pressure, the residue is triturated with ethyl acetate and filtered. The solid is dissolved in 5 ml of DMF, then a mixture of 5 ml of DMF with 200 μ l of piperidine is added and the reaction mixture is evaporated under reduced 10 pressure. The residue is dissolved in 33 % by volume acetic acid and purified on a Sephadex G-25 column. The fractions containing the main product are further purified by using MPLC method.

15 Eluent A: 70 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution and 30 % by vol. of methanol

B: 30 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution and 70 % by vol. of methanol.

11 The pure fractions are lyophilized twice to obtain 11 mg of the aimed product; $R_f 2 = 0.35$, $R_f 7 = 0.187$.

20 Example 4

Preparation of Lys⁵[Lys(ϵ -Fmoc)]⁸-GnRH-III

The method described in Example 1 is followed with the difference that Boc-L-Lys(ϵ -Fmoc)-OH is used instead of Boc-L-Lys(ϵ -Z)-OH in position 8 of the GnRH-III sequence whereas 25 in position 5 Boc-L-Lys(ϵ -Z)-OH is employed instead of Boc-His(Tos)-OH as protected amino derivative. The purification is accomplished by using the method of Example 1. A crude product is obtained in a yield of 335 g (with a chemical

purity of about 80 %); $R_f2 = 0.55$.

Example 5

Preparation of $\text{Lys}^4[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$

By using 1 mmol of BHA resin Example 1 is followed with
5 the difference that Boc-Lys(ϵ -Fmoc)-OH is used as protected
amino acid in position 8 and Boc-Lys(ϵ -Z)-OH in position 4 of
the peptide. After being purified on Sephadex G-25 column,
the crude peptide is obtained in a yield of 1.04 g, with a
purity of 80 %; $R_f2 = 0.29$.

10 **Purification:**

A solution containing 550 mg of crude product in 20 %
by volume acetic acid is applied onto a MPLC column according
to Example 2 and eluted first with 200 ml of 20 % by volume
acetic acid (isocratic elution) and then purified by using
15 gradient elution using 400 ml each of the following solutions:

Solution A: 20 % by volume acetic acid

Solution B: a 3:1 mixture of solution A and isopropanol.

The fractions are collected and lyophilized to result
in a yield of 217 mg of the aimed product; $R_f2 = 0.45$, $R_f7 =$
20 0.18.

Example 6

Preparation of $\text{Lys}^4\text{-GnRH-III}$

To a solution of 200 mg of the crude peptide obtained
in Example 5 in 10 ml of DMF, 15 ml of DMF containing 10 % of
25 piperidine are added under cooling with ice-water. One hour
later the reaction mixture is evaporated and the residue is
purified by using MPLC and gradient elution with 25 % acetic
acid up to a 2:1 mixture of 25 % acetic acid and methanol.

Thus, 68 mg of a pure product are obtained which proved to be uniform on the basis of TLC and HPLC analysis; $R_{f1} = 0.5$, $R_{f2} = 0.67$, $R_{f3} = 0.05$.

Example 7

5 **Preparation of $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Ac})]^4\text{-GnRH-III}$**

To a solution containing 200 mg of crude peptide obtained in Example 5 in 30 ml of DMF, DIEA and 130 mg of imidazole are added, then the mixture of 5 ml of dichloromethane (DCM) and 200 μl of acetic acid anhydride are dropped thereto under stirring and cooling. After one hour the reaction mixture is evaporated under reduced pressure. The residue is triturated with diethyl ether, the ethereal supernatant is decanted and the residue is dissolved in 15 ml of DMF. Then 2 ml of DMF containing 200 μl of piperidine are added and one hour later it is evaporated. The residue is dissolved in 20 % acetic acid and purified by using MPLC method. The elution is carried out by using gradient elution (composed of 20 % acetic acid and a 6:4 mixture of 10 % acetic acid and methanol) to give 70 mg of a pure product which proved to be uniform on the basis of TLC and HPLC analysis; $R_{f2} = 0.067$, $R_{f7} = 0.087$.

Example 8

Preparation of $\text{Glu}^6\text{-GnRH-III}$

Example 1 is followed with the difference that Boc-Glu-25 $\sim (\text{OCH}_x)\text{-OH}$ is used as protected amino acid in position 6 of the GnRH-III sequence. The purification is accomplished according to Example 2 by using gradient elution in ammonium acetate buffer solution. Characteristic values of the product: $R_f =$

0.19, R_f 7 = 0.086.

Example 9

Preparation of cyclo[Asp⁶-Lys⁸]-GnRH-III

After preparing hydrochloride salt according to Example 5 3 by using the lamprey GnRH-III decapeptide as starting substance, the cyclization is carried out according to Example 3. The product is purified according to Example 2.

R_f 2 = .

Example 10

10 **Preparation of D-Ala¹⁰-GnRH-III**

Example 1 is followed with the difference that, instead of Boc-Gly-OH, Boc-D-Ala-OH protected amino acid is coupled as first amino acid to the benzhydrylamine resin. The purification is accomplished according to Example 2. R_f 2 =

15 **Example 11**

Preparation of H-D-Trp¹,[Lys(ϵ -Fmoc)]⁸,D-Ala¹⁰-GnRH-III

Example 1 is followed with the difference that in the GnRH-III sequence Boc-D-alanine is coupled as first amino acid: in the case of lysine of position 8 Boc-Lys(ϵ -Fmoc)-OH 20 protected amino acid and to the N-terminal of the decapeptide Boc-D-Trp-OH protected amino acid are coupled.

The purification is accomplished according to Example 1 on Sephadex G-25 column. The intermediary derivative is purified by using gradient elution according to Example 1.

25 **Example 12**

Preparation of Ac-D-Trp¹,D-Ala¹⁰-GnRH-III

From the protected peptide-BHA resin prepared according to Example 11 the Boc group is removed according to Example

1, then the peptide-BHA resin having a free amino terminal is acetylated with a mixture containing acetic acid anhydride and imidazole. Thereafter, the aimed peptide is cleaved from the resin by liquid HF according to Example 1, the protecting 5 group is split off according to Example 6, and the product is purified according to Example 2.

Example 13

Preparation of H-D-Trp¹,D-Ala¹⁰-GnRH-III

The Fmoc protective group is removed according to 10 Example 6 from the protected intermediary peptide prepared according to Example 11. Then the purification of the crude product is carried out by following Example 2.

Example 14

Preparation of [Trp(For-Ind)]^{3,7}-GnRH-III

15 Example 1 is followed with the difference that in position 8 of the GnRH-III sequence Boc-Lys(ε-Z)-OH, in positions 3 and 7 Boc-Trp(For-Ind)-H protected amino acid derivative are used. The purifications are carried out by following Example 1. $R_f 2 =$

20 **Example 15**

Preparation of Phe⁷-GnRH-III

Example 1 is followed with the difference that Boc-phenylalanine is used in position 7 of the GnRH-III sequence. The purification is carried out by following 25 Example 1. $R_f 2 =$

Example 16

Preparation of GnRH-III(1-9)-ethylamide

According to the GnRH-III sequence the protected amino

acid is coupled by starting from 1.46 mmol of Boc-Pro-Merrifield resin by following Example 1. The peptide protected on its side chains is cleaved from the resin by stirring it with a 20 % by volume ethylamine solution in DMF at 10 °C for 48 hours. $R_f 2 = 0.5$.

After evaporating DMF under reduced pressure, the residue is triturated with diethyl ether. The protective groups of the side chain are removed from the crude protected peptide by using liquid hydrogen fluoride according to Example 1. The crude peptide 16 is purified first on a Sephadex G-25 column followed by medium pressure liquid chromatography to give 215 mg of the aimed product, $R_f 2 = 0.31$.

Example 17

Preparation of Lys⁵,D-Trp⁶-hGnRH

Starting from 0.5 mmol of BHA resin and following the method of Example 1, as protected amino acids Boc-D-Trp-OH is used for the synthesis instead of Boc-Gly in position 6 and Boc-L-Lys(ε-Z)-OH instead of Boc-L-Tyr(Bzl)-OH in position 5 according to the sequence of amino acids of human GnRH. The purification is carried out according to Example 1 by using Sephadex G-25. The gradient elution is performed with 400 ml each of the following solutions:

A: 70 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution (pH 4.00) and 30 % by vol. of methanol

B: 30 % by vol. of 0.05 M ammonium acetate solution (pH 4.00) and 70 % by vol. of methanol

The solution obtained is lyophilized 3 times for removing the ammonium acetate to give 52 mg of the aimed

product; $R_f 2 = 0.34$, $R_f 7 = 0.21$.

Example 18

Preparation of Lys⁴,D-Trp⁶-hGnRH

Example 1 is followed according to the amino acid sequence of hGnRH with the difference that in position 6 Boc-D-Trp-OH is used, and in position 4 Boc-L-Lys(ϵ -Z)-OH protected amino acid derivative is used instead of Boc-L-Ser(Bzl)-OH. The purification of the product is performed also according to Example 17 to obtain 60 mg of pure product,

10 $R_f =$

Example 19

Preparation of H-Glu¹,D-Trp⁶-hGnRH

Example 1 is followed according to the amino acid sequence of hGnRH with the difference that in position 6 Boc-D-Trp-OH is used instead of Boc-glycine whereas in position 1 Boc-L-Glu(OCHx)-OH protected amino acid derivative is used instead of pyroglutamic acid. The product is purified according to Example 17, except that after the gradient elution with ammonium acetate a step of making free from 20 salts is inserted, wherein the gradient elution is carried out on MPLC column by using 300 ml each of the following solutions:

Solution A: 20 % by volume acetic acid

Solution B: a 3:1 mixture of solution A and isopropanol

25 The pure fractions are collected and lyophilized to give 53 mg of the aimed product; $R_f 1 = 0.29$; $T_f 17 = 0.19$.

Example 20

Preparation of Lys⁵,D-Phe⁶-hGnRH(1-9)-ethylamide

According to Example 16 Boc-Pro-Merrifield resin is used as starting material but the synthesis is carried out according to the sequence of human GnRH, except that in position 6 Boc-D-Phe-OH and in position 5 Boc-Lys(ϵ -Z)-OH are used as protected amino acids. The peptide is cleaved from the resin by stirring in ethylamine at 0 °C for 8 hours, then stirring at room temperature overnight while ethylamine evaporates. Thereafter, the protected nonapeptide ethylamide is dissolved from the resin by washing with methanol and DMF. The solution obtained is evaporated and the residue is triturated with ether until it solidifies. The product obtained is treated with liquid HF according to Example 1, then the product is purified by HPLC method according to Example 2.

Example 21

Preparation of Lys⁴,D-Phe⁶-hGnRH(1-9) ethylamide

Example 20 is followed with the difference that Boc-Lys(ϵ -Z)-OH is used as protected amino acid in position 4.

Example 22

D-Cpa⁶

Preparation of Lys⁵,D-Cpa⁶-GnRH(1-9) ethylamide

Example 20 is followed with the difference that instead of Boc-D-Phe-OH Boc-D-Cpa-OH is used as protected amino acid in position 6.

HUMAN CELL LINES USED IN THE IN VITRO EXPERIMENTS

MCF-7 human mammary carcinoma cell line was stabilized in 1973 by Soule et al. from the pleural fluid of a patient suffering from mammary carcinoma. MDA-MB-231 human mammary carcinoma cell line was isolated and stabilized by Cailleau et al. in 1974 similarly from pleural fluid. Both cell lines

grow in monolayer. MCF-7 and MDA-MB-231 human mammary carcinoma cell lines are maintained in plastic flasks (Greiner), in Dulbecco-modified Eagle-MEM (DMEM, GIBCO) liquid nutrient medium containing 10 % of fetal calf serum.

5 MCF-7 cell line is estradiol receptor (ER)-positive containing proteins specifically binding GnRH [B. Vincze et al.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 427 (1990); B. Vincze et al.: Cell Proliferation 25, 518 (1992)]. Thus, it represents a useful model system for investigating the direct 10 effect of GnRH mediated by the GnRH receptor.

Being ER-negative and GnRH receptor-positive, MDA-MB-231 cell line is similarly suitable to study the direct effect of GnRH. PC3 human prostate carcinoma cell line was stabilized in cell culture by Kaighn et al. in 1979. The cells are of 15 epithelial type and form compact colonies in clonogenic assays. The Ishikawa cell line originates from human endometrial adenocarcinoma [M. Nishida et al.: Acta Obstet. Gynecol. Jpn. 37, 1103-1111 (1985)], it is epithelial in its character and contains steroid as well as GnRH receptors.

20

Example A

DOSE-SURVIVAL INVESTIGATIONS WITH GNRH ANALOGUES ON MCF-7, MDA-MB-231 HUMAN MAMMARY CARCINOMA, PC3 PROSTATE CANCER AND ISHIKAWA ENDOMETRIUM TUMOR CELL CULTURES

25 The examination gives accurate information about the cell-damaging effect of the substance tested as a function of varying doses. The treatment was carried out once; the colonies formed from the surviving cells were counted after

8-12 days. When using hormones, the substances were in general not toxic and possessed the great advantage of being cell- or receptor-specific, respectively. GnRH analogues were phase-specific, they inhibited but did not destroy the cells 5 in G0/G1 phase. A part of the arrested cells again entered the cycle, an other part of them might be destroyed (apoptosis). The colonies formed from arrested cells did not achieve the countable colony size in the day of counting the colonies (the colony number may be identical, the colony size cannot 10 be identical). In the case of a dose-response investigation, colonies containing less than 15 cells were not counted.

300 cells were put into each Petri dishes of 3.5 cm in diameter. The treatment was once carried out 24 hours 15 after setting, then the colonies formed were counted after 8-12 days. The cells were treated once after 24 hours with 1-50 μ M of the GnRH analogues of Examples 2, 3, 6, 7, 8, 14, 15 and 17 or with 1-50 μ M of GnRH-III, respectively. The percentages of inhibition obtained on MCF-7, MDA-MB-231, PC3 20 and Ishikawa cells, respectively, together with the dose of the active agent used are shown in Table 1.

Based on these investigations, when used in a dose of (50 μ M, the known synthetic GnRH-III peptide resulted in a 45 % and 49 % inhibition, respectively, of colony formation of 25 MCF-7 and MDA-MB-231 cell cultures, respectively. Such a significant inhibition has not been observed till now by using any GnRH agonist (Ovurelin, Buserelin) or even GnRH antagonist (MI-1544). GnRH-III did not inhibit the Ishikawa cell line

within the dose range used and it resulted only in a 21 % inhibition of colony formation of the PC3 prostate cell culture. The effect of GnRH-III peptide was exceeded by the compound of Example 17 which caused an inhibition of 65 % on 5 MCF-7 and 63 % on MDA-MB-231 (see Table 1). Beside the compound of Example 17, the peptides of Examples 6 and 7 proved to be most effective (35-42 %) on the MDA-MB-231 mammary carcinoma cell culture (Table 1). On PC3 prostate tumour cell culture, the compound of Example 8 administered 10 in a dose of 50 μ M induced the strongest inhibition (31 %) whereas compounds 6 and 7 did not influence and compound 17 weakly inhibited the colony-forming ability of the PC3 cell line within the dose range used (Table 1). When employed in 50 μ M dose on the Ishikawa endometrium tumour cell culture, 15 the following results were achieved: 13 % inhibition of colony formation by compound 3; 21 % by compound 6; 14 % by compound 7; 2 % by compound 8; 15 % by compound 17; and 24 % by compound 14.

In these studies the D-Trp⁶-hGnRH analogue (Sigma Co.) 20 commonly used in the tumour therapy was employed as control. It appears from the data of Table 1 that, among the analogues tested, the analogues of Examples 2 and 15 showed a weak if any effect. Analogues 14 and 19 approximated the activity of the control. Other analogues (3, 6, 7 and 8) exceeded the 25 inhibitory effect of control while analogue 17 resulted in an about twice stronger inhibition.

Example B

INHIBITION OF THE CELL DIVISION OF HUMAN TUMOUR CELL LINES

Method of *in vitro* treatment

5 After being treated with trypsin, 300,000 each of MCF-7, MDA-MB-231, PC3 or Ishikawa cells, respectively, were passed into Petri dishes of 10 cm in diameter. Starting from the day following the setting, the cells were treated with 1-50 μ M of the GnRH analogue in the exponential growth phase.

10 During the experiment lasting for 5 days, the cells were treated in every two days with the peptide hormone dissolved in the nutrient medium, then the cell count was determined on the sixth day.

When used in 30 μ M dose, GnRH-III exerted an inhibition of 35-40 % both on MCF-7 as well as MDA-MB-231 cells. Based on our preliminary investigations, Ovurelin or Buserelin as hGnRH agonists did not induce a significant change in the cell count on the MCF-7 ER-positive cell line (5-15 % inhibition) after 6 days' treatment; whereas they resulted in a 25-30 % inhibition of cell proliferation on the DMA-MB-231 ER-negative cell line.

When used in a dose of 30 μ M, the anti-proliferation effect of GnRH-III agreed with the direct antitumour effect of known GnRH antagonists (mammary GnRH derivatives containing several D-amino acids, MI-1892 and MI-1544) on both mammary tumour cell lines (Table 2).

The proliferation-inhibiting effect of both substances 6 and 7 was nearly identical (27-31 %) with the direct

proliferation-inhibiting effect of GnRH antagonists containing several D-amino acids (MI-1544, MI-1892, SJ-1004) (Table 2).

As shown in Table 2, the proliferation-inhibiting effect of the substances, except compound 15, agreed with the 5 results of inhibition of colony formation within certain limits. Based on our experiences obtained in investigations during several years, a close correlation exists between the inhibition of colony formation and the *in vivo* effectiveness of the substances, too.

10 The compositions of known peptides used as reference substances in the biological investigations are as follows.

MI-1892:

Ac-D-Trp^{1,3},D-Cpa²,Lys⁵,[β -Asp(DEA)]⁶,D-Ala¹⁰-hGnRH
(Hungarian patent application No. P 93-00853)

15

MI-1544:

Ac-D-Trp^{1,3},D-Cpa²,D-Lys⁶,D-Ala¹⁰-hGnRH
[M. Kovács et al.: Peptides 10, 925-931 (1989)]

20

SJ-1004:

D-Phe²,D-Trp³,D-Lys⁶-hGnRH

GnRH-III:

pGlu-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

25

Decapeptyl:

pGlu-His-Trp-S r-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Table 1
Inhibition of the colony formation on various human
tumor cell lines

	Compound	Cell line	Dose	Inhibition
	<u>Example No.</u>			%
5	2. Lys ⁵ -GnRH-III	MCF-7	50 μ M	0
		MDA-MB-231	50 μ M	0
10	3. Lys ⁵ -cyclo- -(Asp ⁶ , Lys ⁸)- -GnRH-III	MCF-7	50 μ M	44
			50 μ M	13
15	6. Lys ⁴ -GnRH-III	MCF-7	10 μ M	15
			50 μ M	40
		MDA-MB-231	10 μ M	18
			50 μ M	35
		Ishikawa	50 μ M	21
		PC3	50 μ M	0
20	7. [Lys(ϵ -Ac)] ⁴ GnRH-III	MCF-7	10 μ M	40
			50 μ M	52
		MDA-MB-231	10 μ M	31
			(50 μ M	42)
25		Ishikawa	50 μ M	14
		PC3	50 μ M	0

Table 1 (contd.)

Compound	Cell line	Dose	Inhibition
Example No.			%
5 8. Glu ⁶ -GnRH-III	MCF-7	50 μ M	44
	MDA-MB-231	50 μ M	25
	Ishikawa	50 μ M	2
	PC3	50 μ M	31
10 17. Lys ⁵ -DTrp ⁶ - hGnRH	MCF-7	10 μ M	39
		50 μ M	65
	MDA-MB-231	10 μ M	30
		50 μ M	63
15	Ishikawa	50 μ M	17
	PC3	50 μ M	18
14. [Trp(For-Ind)] ³ , ⁷ - -GnRH-III	MCF-7	50 μ M	31
	Ishikawa	50 μ M	24
20 15. Phe ⁷ - -GnRH-III	MCF-7	50 μ M	26
	MDA-MB-231	50 μ M	21
19. H-Glu ¹ ,D-Trp ⁶ - -hGnRH	MCF-7	10 μ M	16.8
		50 μ M	32.7
25	D-Trp ⁶ -hGnRH (Decapeptyl)	10 μ M	17.1
		50 μ M	36.7
	MDA-MB-231	10 μ M	15.7
		50 μ M	38.7

Tabl 2

Inhibition of cell proliferation by GnRH analogues on
various human tumor cell lines

5	Compound	Cell line	Dose	Inhibition
	<u>Example No.</u>			%
	MI-1544	MCF-7 (2x)	30 μM	36
		MDA-MB-231 (2x)	30 μM	34
		Ishikawa (2x)	30 μM	8
10		PC3 (2x)	30 μM	24
	MI-1892	MCF-7 (2x)	30 μM	35
		MDA-MB-231 (2x)	30 μM	35
		Ishikawa (2x)	30 μM	14
15		PC3 (2x)	30 μM	33
*				
	SJ-1004	MCF-7 (2x)	30 μM	17
		MDA-MB-231 (2x)	30 μM	23
		Ishikawa (2x)	30 μM	8
20		PC3 (2x)	30 μM	10
	6. Lys ⁴ -GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 μM	27
		MDA-MB-231 (2x)	30 μM	28
25	7. [Lys(ε-Ac)] ⁴ - GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 μM	31
	8. Glu ⁶ -GnRH-III	MCF-7 (2x)	30 μM	18

Table 2 (contd.)

Compound	Cell line	Dose	Inhibition
<u>Example No.</u>			%
5 15. Phe ⁷ -GnRH-III	MCF-7	(2x) 30 μ M	0
	GnRH-III	MCF-7 (2x) 30 μ M	40
		MDA-MB-231 (2x) 30 μ M	39
		PC3 (2x) 30 μ M	10
10	Ishikawa	(2x) 30 μ M	8

Notes to Tables 1 and 2:

MCF-7: mammary tumor cell line of human origin

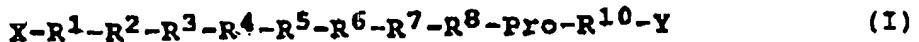
MDA-MB-231: mammary tumor cell line of human origin

15 PC3: prostate tumor cell line of human origin

Ishikawa: endometrium tumor cell line of human origin

Claims

1. Compounds of general formula (I),



5 wherein

X means hydrogen, acetyl group or propionyl group when R¹ is different from pGly; or an intramolecular acid amide bond when R¹ stands for pGlu;

10 R¹ stands for pGlu, Glu, D-Trp, D-Cpa, D-Nal or D-Phe;

R² means His, D-Phe or D-Cpa;

R³ represents D-Cpa, D-Pal or L- or D-Trp optionally protected on the indolyl moiety;

R⁴ stands for Ser; or Lys optionally protected on the ϵ -amino group;

15 R⁵ means Tyr; or Lys optionally protected on the ϵ -amino group; or His;

R⁶ stands for Asp, Glu, D-Lys and optionally ϵ -amino-methylated derivatives thereof; as well as D-Trp, D-Phe, D-Leu, D-Ala, D-Cpa or D-Arg;

20 R⁷ represents Phe, Leu or N-Me-Leu; or L-Trp optionally protected on the indolyl moiety;

R⁸ means Lys optionally protected on the ϵ -amino group; Arg, Gln; or R⁶ and R⁸ together can form an intramolecular ring through the ϵ -amino group of Lys when R⁶

25 is Asp and R⁸ means Lys;

R¹⁰ stands for Gly, D-Ala or a valence bond; and

Y represents OH or NH₂ group when R¹⁰ means Gly or D-Ala; or an ethylamide group when R¹⁰ means a valence bond,

as well as the pharmaceutically acceptable salts and esters of these compounds.

2. A compound as claimed in claim 1 selected from the group consisting of

5 $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^5\text{-GnRH-III}$,
 $\text{Lys}^5\text{-GnRH-III}$,
 $\text{Lys}^5\text{, cyclo[Asp}^6\text{-Lys}^8\text{]-GnRH-III}$,
 $\text{Lys}^5\text{, }[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
 $\text{Lys}^4\text{, }[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8\text{-GnRH-III}$,
10 $\text{Lys}^4\text{-GnRH-III}$,
 $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Ac})]^4\text{-GnRH-III}$,
 $\text{Glu}^6\text{-GnRH-III}$,
 $\text{cyclo[Asp}^6\text{-Lys}^8\text{]-GnRH-III}$,
 $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
15 H-D-Trp^1 , $[\text{Lys}(\epsilon\text{-Fmoc})]^8$, $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
 Ac-D-Trp^1 , $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
 H-D-Trp^1 , $\text{D-Ala}^{10}\text{-GnRH-III}$,
 $[\text{Trp(For-Ind)}]^3,7\text{-GnRH-III}$,
 $\text{Phe}^7\text{-GnRH-III}$,
20 $\text{GnRH-III(1-9)-ethylamide}$,
 Lys^5 , $\text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
 Lys^4 , $\text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
 H-Glu^1 , $\text{D-Trp}^6\text{-hGnRH}$,
 Lys^5 , $\text{D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$,
25 Lys^4 , $\text{D-Phe}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$,
 Lys^5 , $\text{D-Cpa}^6\text{-hGnRH(1-9)-ethylamide}$,

as well as pharmaceutically acceptable salts and esters of these compounds.

3. A pharmaceutical composition, which c o m p r i s e s as active ingredient a novel compound of general formula (I), wherein R¹-R⁸, R¹⁰, X and Y are as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof in admixture with carriers and/or additives commonly used in the pharmaceutical industry.
4. A pharmaceutical composition as claimed in claim 3, which c o m p r i s e s as active ingredient a compound according to claim 2 or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.

NOVEL GNRH ANALOGUES WITH ANTITUMOUR EFFECT AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS CONTAINING THEM AS ACTIVE AGENTS

5

Abstract

10 The invention relates to peptides of general formula
(I),



wherein

15 X means hydrogen, acetyl group or propionyl group when R¹
is different from pGly; or an intramolecular acid amide
bond when R¹ stands for pGlu;

R¹ stands for pGlu, Glu, D-Trp, D-Cpa, D-Nal or D-Phe;

R² means His, D-Phe or D-Cpa;

20 R³ represents D-Cpa, D-Pal or L- or D-Trp optionally
protected on the indolyl moiety;

R⁴ stands for Ser; or Lys optionally protected on the ϵ -amino
group;

25 R⁵ means Tyr; or Lys optionally protected on the ϵ -amino
group; or His;

R⁶ stands for Asp, Glu, D-Lys and optionally ϵ -amino-
methylated derivatives thereof; as well as D-Trp, D-
Phe, D-Leu, D-Ala, D-Cpa or D-Arg;

R⁷ represents Phe, Leu or N-Me-Leu; or L-Trp optionally
protected on the indolyl moiety;

R⁸ means Lys optionally protected on the ϵ -amino group; Arg, Gln; or R⁶ and R⁸ together can form an intramolecular ring through the ϵ -amino group of Lys when R⁶ is Asp and R⁸ means Lys;

5 R¹⁰ stands for Gly, D-Ala or a valence bond; and
Y represents OH or NH₂ group when R¹⁰ means Gly or D-Ala;
or an ethylamide group when R¹⁰ means a valence bond,
as well as to the pharmaceutically acceptable salts and esters
10 of these compounds, furthermore to pharmaceutical compositions
of antitumour effect containing these compounds as
active ingredients.

The GnRH analogues according to the invention are prepared by using processes known in the chemistry of peptides.